Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Versuche zur Wirkungsweise von heterologen Antilymphozytenglobulinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ernst-Peter Rieber
aus Tübingen

1969

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. E. Bock

Versuche zur Wirkungsweise von heterologen Antilymphozytenglobulinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Ernst-Peter Rieber
aus Tübingen

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Bohle

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG · Tübingen

I N H A L T :

Seite

I) EINLEITUNG..... 1 - 5

II) MATERIAL UND METHODEN..... 6 - 14

1) Tiere..... 6

2) Herstellung des Anti-Maus-Thymusserums..... 6 - 8

a) Immunisierung der Kaninchen..... 6 - 7

b) Gewinnung des Antiserums..... 7 - 8

3) Mercaptoaethanolbehandlung..... 8

4) Präparation der IgG-Fraktion..... 8 - 9

5) Proteinbestimmung..... 9

6) Lymphagglutinationstest..... 10

7) Zytotoxischer Test..... 10 - 11

8) Analyse im Sucrose-Dichtegradienten..... 11

9) Transplantation..... 11 - 12

10) "Graft versus host reaction"..... 12 - 13

11) Fluoreszenztechnik..... 13 - 14

12) Histologie..... 14

13) Zählung der Zellen..... 14

III) ERGEBNISSE..... 15 - 34

A) Wirkung des AMT-IgG in vitro..... 15 - 19

A1) Bestimmung der aktiven Fraktion des AMTS durch Behandlung mit Mercaptoaethanol..... 15

A2) Bestimmung der aktiven Fraktion des AMTS durch Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten.... 16

Seite

A3) Bestimmung der Lymphagglutinationstiter. 16 - 17

A4) Zytotoxischer Test..... 17

A5) Prüfung der Serumfraktionen auf Reinheit 17 - 18

A6) Nachweis des AMT-IgG auf den Lymphozyten mit Hilfe der Fluoreszenztechnik..... 18 - 19

B) Wirkung des AMT-IgG in vivo..... 19 - 34

B1) Wirkung des AMT-IgG auf die Überlebenszeit von allogenen Transplantaten.....19 - 26

B2) "Graft versus host reaction" unter AMT-IgG-Behandlung..... 26 - 28

B3) Wirkung des AMT-IgG auf die durch Bordetella pertussis induzierte Lymphozytose. 28 - 32

B4) Histologische Veränderungen unter kurzzeitiger Behandlung mit AMT-IgG..... 32 - 34

IV) D I S K U S S I O N..... 35 - 47

V) ABBILDUNGEN..... 48 - 54

VI) LITERATURVERZEICHNIS..... 55 - 62

I) E I N L E I T U N G.

Im Jahre 1899 berichtete METCHNIKOFF (44) zum ersten Mal von der agglutinierenden und zytotoxischen Wirkung eines gegen Rattenleukozyten gerichteten heterologen Antiserums, welches er durch subkutane Injektion von Rattenmilz- und Lymphknotenzellen im Meerschweinchen erhalten hatte und das speziesspezifisch vor allem auf die mononukleären Zellen der Ratte wirkte. METCHNIKOFF erwähnte damals schon die Möglichkeit, daß man mit solchen Antiseren auf physiologische Weise die Funktion von Organsystemen untersuchen könnte, die einer chirurgischen Entfernung aus dem Organismus nur schwer oder gar nicht zugänglich sind.

Im gleichen Jahr zeigte DEUTSCH (16), daß die Bildung von Antikörpern an die Milzzellen gebunden ist, und daß die Immunität gegen ein bestimmtes Antigen durch die Überpflanzung von Milzzellen von einem sensibilisierten Tier auf ein nicht sensibilisiertes übertragen werden kann.

Schon damals waren also die theoretischen Kenntnisse für die Beeinflussung immunologischer Reaktionen mit einem Antilymphozytenserum (=ALS) vorhanden, doch beschäftigte man sich in der Folge für fast 50 Jahre bei der Untersuchung des ALS beinahe ausschließlich mit den morphologischen und quantitativen Veränderungen

von Leukozyten und lymphatischen Geweben, besonders im Blick auf die Behandlungsmöglichkeit bestimmter Arten von Leukämie (7,19,54,12,14). Erst als die technischen Fortschritte in der Transplantationschirurgie die Suche nach einem spezifisch wirkenden Immunosuppressivum immer dringlicher werden ließen und sich zugleich die zentrale Stellung der Lymphozyten im immunologischen Abwehrsystem vor allem durch die Arbeiten von GOWANS (22,23), AMOS (2), MITCHISON (45), ELKINS (18) und H.PICHLMAIER (55) immer deutlicher zeigte, fand der Versuch wachsende Beachtung, diese Zellen in ihrem Wirken durch ein spezifisches Agens zu hemmen. Da die herkömmlichen Immunosuppressiva wie Glukokortikoide, Zytostatika und Röntgenbestrahlung nicht ausschließlich auf ein wichtiges Glied im Abwehrmechanismus einwirken und deshalb zu starken unerwünschten Nebenreaktionen führen können, schien die Ausschaltung der Lymphozyten durch ein spezifisch gegen sie gerichtetes Antiserum eine vorteilhafte Methode zur Unterdrückung der immunologischen Abwehr zu sein. Als erster überzeugender Befund in dieser Richtung wurde 1956 von INDERBITZIN (30,31) eine Abschwächung der Tuberkulinreaktion durch ALS beschrieben, und 1961 konnten WAKSMAN, ARBOUYS und ARNASON (68) zeigen, daß durch heterologes ALS die Überlebenszeit von homologen Hauttransplantaten beim Meerschweinchen beträchtlich verlängert werden kann. Verschiedene Arbeitsgruppen wie die von LEVEY und MEDAWAR (35,36,37), WAKSMAN (68), WOODRUFF

(71,72), RUSSE und CROWLE (61), MONACO (47), STARZL (64) sowie R.PICHLMAYR (56) haben sich seither eingehend mit dem ALS beschäftigt und dabei seine immunosuppressive Potenz vielfältig dokumentiert. Von einigen Autoren wie z.B. STARZL (64) wurde in letzter Zeit über ermutigende Ergebnisse bei Nierentransplantationen auch beim Menschen berichtet, bei denen die Anwendung von ALS eine beträchtliche Reduzierung der normalerweise benötigten Dosen von herkömmlichen immunosuppressiven Mitteln ermöglichte. Um bei der Behandlung mit Antilymphozytenserum die Gefahr einer Serumkrankheit oder eines anaphylaktischen Schocks zu vermindern, muß die aktive Fraktion des ALS isoliert und in gereinigter Form injiziert werden.

Auf welche Weise das ALS im Organismus eine Immunreaktion unterdrückt, ist bis heute noch ungeklärt. Naheliegend ist die Deutung, daß das ALS auf Grund seiner schon lange bekannten zytotoxischen Eigenschaft die Lymphozyten im behandelten Individuum zerstört und so die Zahl der Antikörper bildenden Zellen vermindert. Da das ALS seine zytotoxische Wirkung in vitro nur bei Anwesenheit von Komplement entfaltet, müßte zur Stützung dieser Theorie der Nachweis erbracht werden, daß die immunosuppressive Wirkung des ALS auch in vivo vom Komplement abhängig ist. Dies konnte durch Untersuchungen wahrscheinlich gemacht werden, die gemeinsam mit Dr.G.Riethmüller durchgeführt wurden und über die

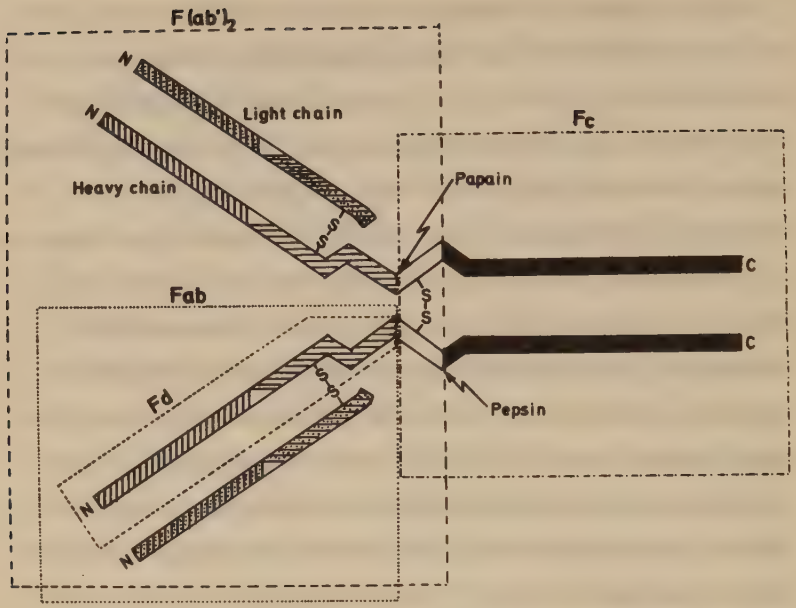


FIG.1. Schematische Darstellung des IgG-Moleküls und seiner Fragmente nach OVARY (53) sowie COHEN und MILSTEIN (13).

bereits an anderer Stelle berichtet wurde (58,59). Hierbei wurde das Zusammenwirken von Antikörper und Komplement bei der Zerstörung von Zellen dadurch verhindert, daß vom Antikörper mit Pepsin ein Teil des Fc-Fragmentes abgedaut wurde, auf dem neben Eigenschaften wie zytophiler Aktivität und Fixation an Hautgewebe auch die Fähigkeit zur Komplementbindung lokalisiert ist. Wie Fig.1 zeigt, ist bei dem so entstandenen $F(ab')_2$-Fragment die Disulfidbrücke zwischen den beiden schweren Ketten und damit der bivalente Charakter des IgG-Moleküls erhalten. So zeigte das $F(ab')_2$-Fragment im

Lymphagglutinationstest eine im Vergleich zum intakten ALS-IgG kaum herabgesetzte Aktivität, ließ jedoch in vitro keine zytotoxische und im Transplantationsversuch keine immunosuppressive Wirkung erkennen. Über entsprechende Ergebnisse berichtete WOODRUFF (73) etwa zu gleicher Zeit.

Ziel der hier beschriebenen Untersuchungen war es, die aktive Fraktion des ALS zu isolieren und ihre Wirkung auf verschiedene immunologische Reaktionen wie die Abstoßung eines allogenen Transplantates und die "graft versus host reaction" zu prüfen. Weiterhin sollte untersucht werden, welchen Einfluß der zeitliche Abstand zwischen der Injektion des Antilymphozytenserums und der Inokulation des Antigens auf die Immunosuppression hat. Schließlich sollten noch die Kinetik der peripheren Lymphozyten sowie die histologischen Veränderungen im lymphatischen Gewebe unter der Behandlung mit der aktiven Fraktion des ALS beobachtet werden. Die Wirkung des ALS-IgG und seines $F(ab')_2$-Fragmentes auf die Bildung von 19 S-Antikörpern in der Milz wurde in Zusammenarbeit mit Dr.G.Riethmüller untersucht. Über diese Experimente wurde gleichfalls schon berichtet (58,59).

II) M A T E R I A L und M E T H O D E N .

1) TIERE:

4-6 kg schwere Kaninchen eines Wildstammes aus einer einheimischen Zucht wurden als Serumspender verwendet. Als Versuchstiere dienten Mäuse aus zwei Inzuchtstämmen, die sich am H-2-locus unterscheiden: 1. der Albinostamm A/NMRI (Naval Medical Research Institute) mit dem Histokompatibilitätsantigen $H\text{-}2^a$, der an der Bundesforschungsanstalt für Viruskrankheiten der Tiere in Tübingen für mehr als 30 Generationen durch Bruder-Schwester-Paarung gezüchtet wurde, und 2. der Stamm C57/Bl/6J/han mit dem $H\text{-}2^b$-Antigen (63) vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover. Wenn nicht anders vermerkt, betrug das Alter der Versuchstiere 6-12 Wochen.

2) HERSTELLUNG DES ANTI-MAUS-THYMUS-SERUMS (AMTS):

a) Immunisierung der Kaninchen:

Als Antigen für die Herstellung eines Antilymphozytenserums dienten die Zellen des Thymus, da 1. NAGAYA und SIEKER (49) zufolge das Antithymuszellenserum eine stärkere immunosuppressive Wirkung hat als ein gegen Lymphozyten aus dem übrigen lymphatischen Gewebe gerichtetes Antiserum, 2. weil die Ausbeute an Zellen aus dem Thymus einer Maus wesentlich größer ist als aus den Lymphknoten eines Tieres und 3. weil die Milz

als Lymphozytenquelle infolge ihres hohen Gehaltes an Erythrozyten und anderen nicht der lymphatischen Reihe angehörenden Zellen für die Herstellung eines spezifisch gegen Lymphozyten gerichteten Antiserums ungünstig ist.

Die Immunisierung der Kaninchen wurde in Anlehnung an das von NAGAYA und SIEKER (49) angegebene Schema durchgeführt. 6 Wochen alte NMRI-Mäuse wurden in Äthernarkose durch Herzpunktion entblutet. Darauf wurde der Thymus steril herauspräpariert, wobei darauf geachtet wurde, daß er mit möglichst wenig Blut kontaminiert war. Auf einem Stahldrahtnetz von 150 mcm Maschenweite wurde er dann mit einer scharfen Schere zerkleinert. Die auf diese Weise frei gewordenen Zellen wurden mit 0,9%iger NaCl-Lsg. durch das Netz gespült, bei 250 g zentrifugiert und 3mal mit 0,9%igem NaCl gewaschen. 1 ml der auf 2 x 10^8 Zellen/ml adjustierten Thymuszellsuspension wurde mit 1 ml Freund's complete adjuvant gut vermischt und je 0,25 ml dieser Emulsion subkutan in die vier Läufe eines Kaninchens injiziert. Auf 3 solcher Injektionen in Abständen von je 1 Woche folgten in achttägigem Intervall noch 2 intravenöse Boosterinjektionen von je 10^8 Thymuszellen pro Tier in die Ohrvenen.

b) Gewinnung des Antiserums:

8 Tage nach der letzten Boosterinjektion wurde jedem Kaninchen aus der Ohrarterie je 100 ml Blut entnommen.

Es wurde zuerst bei 20°C für 1 h und dann bei 4°C für 12 h stehen gelassen. Darauf wurde es bei 1200 g zentrifugiert; das überstehende Serum wurde abgehebert und zur Inaktivierung des Komplements für 30 min auf 56°C im Wasserbad erwärmt. Danach erfolgte eine zweimalige Absorption mit NMRI-Mauserythrozyten, wobei 5 Teile Serum mit 1 Teil dicht gepackter Erythrozyten zuerst 30 min bei 37°C, dann 30 min bei 4°C unter wiederholtem Umschütteln inkubiert wurden. Nach Abzentrifugieren der Erythrozyten wurde das Serum in Portionen von je 10 ml aufgeteilt und bei -20°C aufbewahrt.

3) MERCAPTOAETHANOLBEHANDLUNG:

0,25 ml Serum wurden mit 0,25 ml Puffer (pH=7,2) und 5 mcl Mercaptoaethanol für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei 4°C für 48 Stunden gegen einen Puffer von pH 7,2 dialysiert, der 1,92 gr Jodacetamid pro Liter enthielt.

4) PRÄPARATION DER IgG-FRAKTION:

Die Präparation der IgG-Fraktion erfolgte in Anlehnung an das von HEIDE und HAUPT (28) angegebene Verfahren. 100 ml Serum wurden im Eisbad mit 19,6 gr $(NH_4)_2SO_4$ langsam unter Umrühren versetzt, was eine Endsättigung des Ammoniumsulfates von 33% ergab. Die ausgefallenen Globuline wurden bei 1200 g abzentrifugiert, in 100 ml aqua dest. aufgenommen und zur Entfernung der mitgefällten Albumine mit dem gleichen Volumen einer 1,68%igen

Diaminoacridinlösung (Rivanol^R) versetzt. Nach vierstündigem Stehen bei 4°C wurde bei 1200 g zentrifugiert und der Überstand zur Entfernung des Rivanols mit soviel Milliliter einer 30%igen NaCl-Lsg. versetzt, daß eine Endkonzentration von 5 % NaCl erreicht wurde. Nach scharfem Zentrifugieren wurde zu dem Überstand $(NH_4)_2SO_4$ bis zu einer Endsättigung von 33 % gegeben. Die ausgefallenen IgG-Globuline wurden noch 3 x mit einer zu 33 % gesättigten Ammoniumsulfat-Lsg. gewaschen, in 100 ml aqua dest. aufgelöst und dann für 48 h bei 4°C gegen einen Puffer dialysiert, der 18 gr NaCl, 11,5 ml 0.2 M KH_2PO_4, 38,5 ml 0.2 M Na_2HPO_4 und 20 ml 1%iges Cialit^R in 2000 ml aqua dest. enthielt(pH=7.2). Nach der Proteinbestimmung wurde die IgG-Lsg. auf eine Konzentration von 10 mg Protein/ml gebracht und in Portionen von 1 ml aufbewahrt.

5) PROTEINBESTIMMUNG:

Nach der Methode von LOWRY (38) wurde zu 0,4 ml der Proteinlösung unbekannter Konzentration 4 ml einer Mischung aus 1 ml 2%igem Kaliumtartrat, 1 ml 1%igem $CuSO_4$ und 98 ml einer Lösung von 2 gr Na_2CO_3 in 100 ml 0.1 n Na OH gegeben. Nach 30 min wurden 0,4 ml einer Mischung von 5 ml H_2O + 8 ml "Folin-Ciocalteus Phenolreagenz" (Merck) unter Schütteln dazugegeben. Nach weiteren 30 min wurde bei 660 nm die Extinktion gemessen und mittels einer Eichkurve die unbekannte Proteinkonzentration errechnet.

6) LYMPHAGGLUTINATIONSTEST:

Der Lymphagglutinationstest wurde in einer Modifikation des von AMOS und PEACOCKE (3) angegebenen Verfahrens ausgeführt. Thymuszellen, die nach dem bei der Immunisierung beschriebenen Verfahren gewonnen waren, wurden 3 mal mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und zuletzt in einer Konzentration von 7 x 10^6 Zellen/ml in einem von GRAY und MONACO (25) angegebenen Puffer aufgenommen, der 2,6 gr Na_2HPO_4, 3,0 gr Na_2EDTA (=Titriplex III), 8,5 gr NaCl und 0,1 gr Cialit^R in 1000 ml aqua dest. enthielt. 0,1 ml dieser Suspension wurden in einem silikonisierten Reagenzgläschen (8 x 100 mm) mit 0,1 ml 5%igem Rinderalbumin und 0,1 ml der Serum- bzw. IgG-Verdünnung vermischt. Für 1 Stunde wurden die Zellen bei 37°C inkubiert, danach wurde ein Tropfen auf einen Objektträger verbracht und sofort unter dem Mikroskop bei 80-facher Vergrößerung auf Agglutination untersucht.

7) ZYTOTOXISCHER TEST:

In Anlehnung an die von BOYSE,OLD und CHOUROULINKOV (10) beschriebene Methode wurde Thymusgewebe aus einer 6 Wochen alten Maus steril entnommen, auf einem feinen Drahtnetz vorsichtig mit wenigen Schnitten in einem Tropfen Zellkulturmedium 199 (DIFCO) zerkleinert und die freigewordenen Zellen mit einigen Millilitern dieses Mediums durch das Netz gespült. Nach einmaligem Zentri-

fugieren bei 220 g wurden die Zellen in Medium 199 zu einer Konzentration von 10^7 Zellen/ml suspendiert. 0,1 ml dieser Suspension wurde mit 0,1 ml Antiserum und 0,1 ml einer 1:4 verdünnten Komplementlösung (Meerschweinchenserum) versetzt. Nach einer Inkubation bei 37°C für 30 min wurde 0,1 ml einer physiologischen Trypanblau-Lsg. zugegeben, welche unmittelbar zuvor durch Vermischen einer 0,2%igen wäßrigen Lösung von chromatographisch reinem Trypanblau mit einer 4,25%igen NaCl-Lösung im Verhältnis 4:1 hergestellt worden war. Nach 2 min wurde der Anteil der gefärbten (= toten) und ungefärbten (= lebenden) Zellen unter dem Mikroskop bestimmt.

8) ANALYSE IM SUCROSE-DICHTEGRADIENTEN:

In einem Reagenzglas aus Zellulose wurde mittels einer Gradientenmaschine ein linearer Sucrosegradient von 5-20% hergestellt und darauf 0,4 ml des rohen Antithymusserums pipettiert. Die Probe wurde im SW 39-Rotor der Spinco L Zentrifuge für 15 Stunden bei 30 000 rpm (≙ 71 000 g) zentrifugiert. Anschließend wurde das Reagenzglas am Boden angestochen und der abtropfende Inhalt in Proben von je 0,5 ml aufgefangen, die dann gegen einen isotonen Phosphatpuffer von pH 7.2 dialysiert wurden.

9) TRANSPLANTATION:

Die Transplantation wurde nach der von BILLINGHAM und MEDAWAR (8) angegebenen Methode ausgeführt. Die

Mäuse wurden durch intraperitoneale Injektion von 0,01 ml einer 2%igen isotonen Evipanlösung pro gr Körpergewicht narkotisiert. Das ungefähr 1 cm^2 große Transplantationsbett wurde auf einem vorher mechanisch enthaarten Hautbezirk an der seitlichen Thoraxwand durch Flachschnitte mit einer scharfen Schere so gestaltet, daß der die großen Hautgefäße führende Panniculus musculosus weitgehend erhalten blieb und den Boden des Bettes bildete. Vom Spender wurde ein angemessen großes vorher enthaartes Stück Haut in der vollen Dicke entnommen, mit einem Skalpell vom Unterhautbindegewebe befreit, auf das Transplantationsbett gebracht und diesem der Größe nach angepaßt. Das Operationsgebiet wurde mit einem Antibiotikum eingepudert, mit einer Lage Zigarettenpapier und 4 Lagen Mull abgedeckt und mit einer um den ganzen Körper herumgeführten 2,5 cm breiten Gipsbinde geschützt. Die Tiere wurden bis zum Erwachen bei 37°C gehalten. Nach 5 Tagen wurde der Verband entfernt.

10) "GRAFT VERSUS HOST REACTION":

Die "graft versus host reaction" wurde nach der von SIMONSEN (62) angegebenen Methode induziert. Neugeborenen Mäusen der (NMRI x C57/Bl) F_1 - Generation wurden innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt je 4 x 10^7 Milzzellen von einer 8 Wochen alten NMRI-Maus mit einer Kanüle der Größe 20 intraperitoneal injiziert. Verwendet wurden nur Milzzellensuspensionen mit über 90 % lebenden Zellen. Um einen Rückfluß des

injizierten Materials zu verhindern, wurde die Kanüle durch die Oberschenkelmuskulatur hindurch in die Peritonealhöhle vorgeschoben. 9 Tage später wurden die Tiere getötet und das Gewicht von Milz und Nieren bestimmt.

11) FLUORESZENZTECHNIK:

Zum Nachweis des Antikörpers auf Zellen mit Hilfe eines fluoreszierenden Antiserums nach MÖLLER (46) wurden die aus Milz, Thymus und Lymphknoten nach dem oben bereits beschriebenen Verfahren aufbereiteten Lymphozyten 3 x mit Medium 199 gewaschen und auf eine Konzentration von 5 x 10^6 Zellen/ml gebracht. 0,5 ml dieser Suspension wurden mit 0,5 ml einer 1:10 verdünnten AMT-IgG-Lsg. 15 min bei 20°C inkubiert, bei 220 g zentrifugiert und 3 x vorsichtig mit Medium 199 gewaschen. Die Zellen wurden in 0,1 ml Medium 199 aufgenommen und mit 0,1 ml einer vorher 2 x mit Mauslymphozyten absorbierten Lösung von "FA Rabbit Globulin Antiglobulin (Goat)" (DIFCO) 20 min bei 20°C inkubiert. Darauf wurden die Zellen 3 x mit physiologischer Kochsalzlösung gewaschen, zuletzt in 0,1 ml aufgenommen und mit 0,1 ml einer 5%igen Rinderalbuminlösung vermischt. 1 Tropfen dieser Suspension wurde auf einen Objektträger gebracht und nach dem Antrocknen sofort unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Bei dieser Methode muß darauf geachtet werden, daß die Zellen bei der Inkubation mit dem fluoreszierenden Serum

noch zu mehr als 90 % leben, da sich tote Zellen diffus mit dem fluoreszierenden Stoff anfärben und so die Erkennung der spezifischen Färbung an der Zelloberfläche sehr erschweren.

12) HISTOLOGIE:

Von den in Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten wurden 5 mcm dicke Schnitte angefertigt und mit H.E. gefärbt.

13) ZÄHLUNG DER ZELLEN:

Die Zahl der Leukozyten im peripheren Blut wurde nach der üblichen Methode durch Aufziehen in Türk'scher Lösung und Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.
Die Blutausstriche für die Differentialblutbilder wurden nach May-Grünwald gefärbt.

III) E R G E B N I S S E .

A) WIRKUNG DES AMT-IgG IN VITRO:

A1) Bestimmung der aktiven Fraktion des AMTS durch Behandlung mit Mercaptoaethanol:

Um einen Hinweis dafür zu erhalten, ob sich die aktive Fraktion des Antilymphozytenserums vorwiegend im Bereich der 19 S-(IgM) oder 7 S-(IgG) Globuline befindet,wurde in einem ersten Versuch eine Probe des AMTS nach der oben angegebenen Weise mit Mercaptoaethanol behandelt, wobei die 19 S-Antikörper fast ganz, die 7 S-Moleküle aber nur zu einem sehr geringen Teil inaktiviert werden. Wie Tab.1 zeigt, war die Lymphozyten agglutinierende Wirkung des AMTS nach der Inkubation mit Mercaptoaethanol im Vergleich zum unbehandelten Serum nur um eine Titerstufe herabgesetzt, was darauf hindeutet, daß die 19 S-Globuline keinen wesentlichen Anteil an der agglutinierenden Aktivität des Antilymphozytenserums besitzen.

TABELLE 1. Lymphagglutinationstiter des AMTS vor und nach Behandlung mit Mercaptoaethanol.

Verdünnung	AMTS[a)]	AMTS, inkubiert mit Mercaptoaethanol
1 : 10	+ + b)	+ +
1 : 20	+ +	+ +
1 : 40	+ +	+ +
1 : 80	+ +	+
1 : 160	+	-
1 : 320	-	-

a) Das AMTS wurde entsprechend der Mercaptoaethanolbehandlung 1:2 verdünnt.
b) + + = mehr als 90 %, + ≅ 50 % der Zellen agglutiniert.

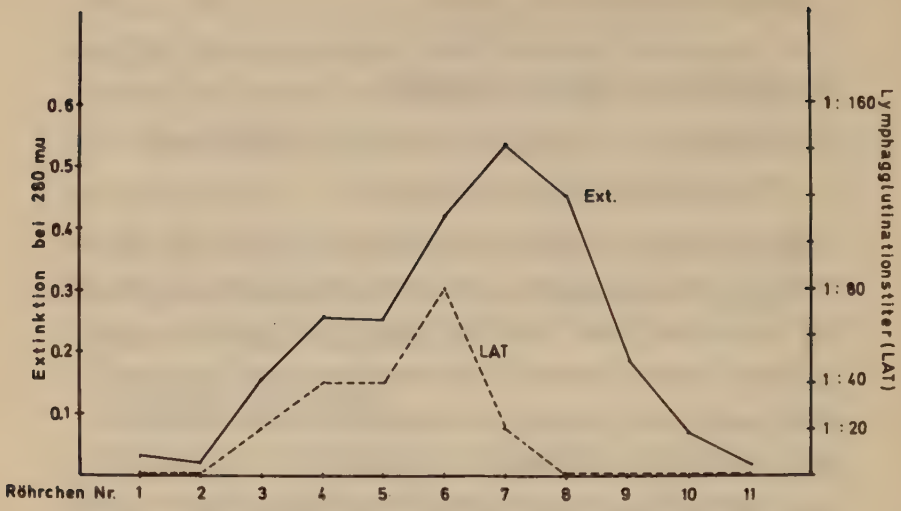


FIG.2. Extinktion und Lymphagglutinationstiter der einzelnen Fraktionen des Anti-Thymus-Serums nach Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten.

A2) Bestimmung der aktiven Fraktion des AMTS durch Zentrifugation im Sucrose-Dichtegradienten:

Wie Fig.2 zeigt, befand sich die Lymphozyten agglutinierende Wirkung des Anti-Maus-Thymus-Serums nach der Zentrifugation im linearen Sucrose-Dichtegradienten von 5 - 20% Sucrose im unteren Mittelbereich in den Fraktionen 3, 4, 5, 6 und 7, d.h. im Bereich der IgG-Globuline. Am Boden des Zentrifugengläschens, im Bereich der IgM-Globuline, fand sich keine Aktivität.

A3) Bestimmung der Lymphagglutinationstiter:

Als Lymphagglutinationstiter wurde diejenige Verdünnung eines Serums bezeichnet, in der es die Test-

Lymphozyten noch zu mehr als 50 % agglutinierte. Er betrug beim rohen AMTS 1:320 - 1:1280; die nach dem oben angegebenen Verfahren hergestellte IgG-Fraktion hatte einen LAT von 1:160 - 1:640, während normales Kaninchenserum keine Agglutination von Maus-Lymphozyten zeigte.

A4) Zytotoxischer Test:

Aus Tab.2 kann man entnehmen, daß das AMTS in vitro eine zytotoxische Wirkung besitzt und daß diese von der Anwesenheit des Komplements abhängt.

TABELLE 2. Zytotoxische Wirkung des AMTS und des AMT-IgG mit und ohne Komplement (C').

Verdünnung	AMTS		AMT-IgG		NKS-IgG[c)]	Kontrolle (kein IgG)
	+C'[a)]	-C'	+C'	-C'	+C'	+C'
1:10	100[b)]	4	97	6	4,5	5,5
1:20	100	7	96			
1:40	100		88			
1:80	95		36			

a) Komplement wurde in Form von Meerschweinchenserum bis zu einer Endkonzentration von 1:12 zugegeben.

b) Die Zahlen bedeuten % gefärbte (=tote) Zellen.

c) = IgG-Fraktion des normalen Kaninchenserums als Kontrolle.

A5) Prüfung der Serumfraktionen auf Reinheit:

Wie die Analyse in der Ultrazentrifuge zeigt (Abb.1,S.48), erhielt man durch die Fraktionierung des Anti-Thymus-

Serums nach der oben angegebenen Methode ein relativ reines IgG. Aus dem Schlierendiagramm läßt sich die Sedimentationskonstante zu 6,9 S errechnen.

A6) Nachweis des AMT-IgG auf den Lymphozyten mit Hilfe der Fluoreszenztechnik:

Um festzustellen, ob und wo sich die AMT-IgG-Moleküle an die lymphoiden Zellen aus den verschiedenen Organen binden, wurden nach der oben angegebenen Methode Milz-, Thymus- und Lymphknotenzellen von der Maus zuerst mit AMT-IgG, darauf mit Fluoreszein-markiertem Antikaninchen-IgG-Serum von der Ziege inkubiert und dann im UV-Licht unter dem Mikroskop betrachtet. Über 80 % der Zellen zeigten die sog. "Ringreaktion", d.h. einen geschlossenen fluoreszierenden Ring um die Zellen (Abb.2,S.49), der nach MÖLLER (46) als positiver Nachweis der gesuchten Moleküle auf der Zelloberfläche gewertet werden kann. Das Zytoplasma und die Kerne dieser Zellen waren nicht gefärbt, was darauf hindeutet, daß das AMT-IgG hauptsächlich auf der Oberfläche der Lymphozyten haftet und von da seine Wirkung auf diese Zellen ausübt. Bei den Lymphozyten aus den verschiedenen lymphatischen Organen konnte kein Unterschied im Anteil der Zellen, die eine Ringreaktion aufwiesen, beobachtet werden. Bei etwas mehr als 10 % der Zellen zeigte auch das Zytoplasma eine diffuse Fluoreszenz und verhinderte damit die Beurteilung der Ringreaktion. Als Kontrolle dienten Lymphozyten, die mit der IgG-Fraktion von

normalem Kaninchenserum inkubiert wurden. Bei ihnen fand sich zu ungefähr 10 % eine der Ringreaktion gleichende Anfärbung, die wahrscheinlich auf einer unspezifischen Adsorption des Kaninchenglobulins auf der Zelloberfläche beruht. Bei Zellen, die ausschließlich mit fluoreszierendem Farbstoff inkubiert waren, wurde keine Ringreaktion beobachtet.

B) WIRKUNG DES AMT-IgG IN VIVO:

Einen regelmäßigen, von zahlreichen Autoren (12, 68, 25, 67) beschriebenen und vielfach dokumentierten Befund bei der Untersuchung der in vivo-Wirkung des Antilymphozytenserums stellt der Abfall der peripheren Lymphozyten dar, der schon wenige Stunden nach einer Injektion von ALS beobachtet werden kann. Er zeigte sich auch bei den Kontrollbestimmungen, die während der im folgenden beschriebenen in vivo-Versuche mit dem AMT-IgG durchgeführt wurden.

B 1) Wirkung des AMT-IgG auf die Überlebenszeit von allogenen Transplantaten:

Als Maß für die immunosuppressive Wirkung eines Antilymphozytenserums kann nach MEDAWAR (40) die "mittlere Überlebenszeit" von allogenen Transplantaten verwendet werden. Sie stellt den Zeitraum dar, der zwischen der Transplantation und dem Zeitpunkt liegt, an dem gerade 50 % der Versuchstiere die letzten überlebenden Reste des Transplantatepithels abgestoßen haben.

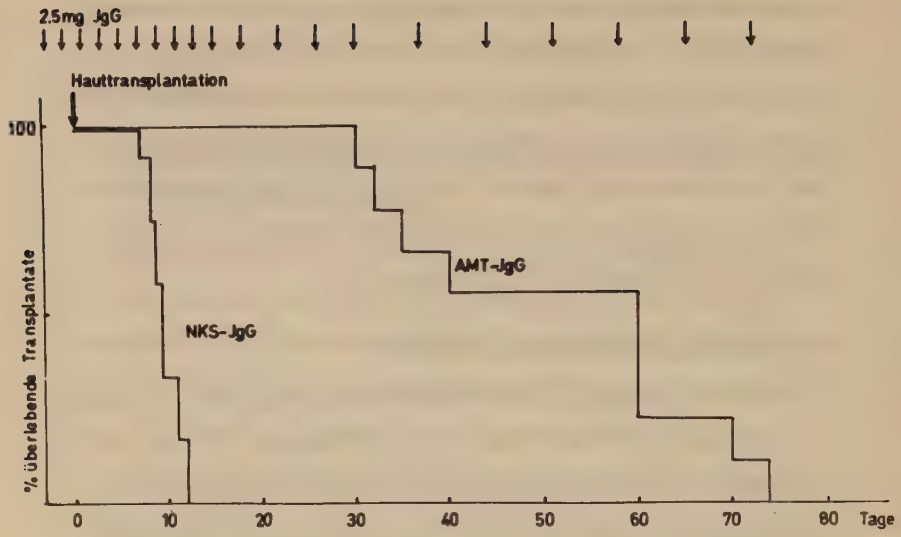


FIG. 3. Einfluß des AMT-IgG auf die Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten (C57/Bl auf NMRI).
NKS-IgG = 12 Tiere, AMT-IgG = 9 Tiere.

Um einen Anhalt für die immunosuppressive Wirkung der verwendeten Seren zu bekommen, wurde in einem ersten Versuch die "mittlere Überlebenszeit" unter Dauerbehandlung mit AMT-IgG bestimmt (Fig.3). NKS-IgG und AMT-IgG wurde Gruppen von je 9 - 12 Tieren intraperitoneal nach folgendem Plan injiziert: Beginnend 3 Tage vor der Transplantation erhielt jedes Tier für 18 Tage je 2,5 mg IgG jeden 2.Tag, darauf 4 x je 2,5 mg alle 4 Tage, schließlich je 2,5 mg in Abständen von einer Woche. Dabei ergab sich bei den mit NKS-IgG behandelten Kontroll-

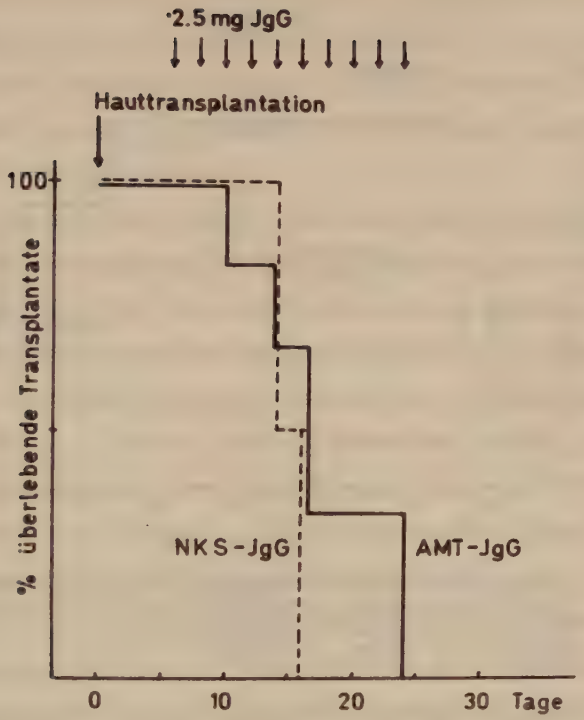


FIG. 4. Wirkung des AMT-IgG auf die Überlebenszeit von allogenen Transplantaten (C57/Bl auf NMRI), wenn die Behandlung erst 3 Tage nach der Transplantation beginnt.
NKS-IgG = 6 Tiere, AMT-IgG = 6 Tiere.

tieren eine "mittlere Überlebenszeit" von 9 Tagen, während unter der Behandlung mit AMT-IgG eine "mittlere Überlebenszeit" von 60 Tagen erreicht wurde, wobei die kürzeste Überlebenszeit 30 Tage, die längste 74 Tage betrug.Bei einer Maus wurden ab dem 30.Tag nicht 2,5, sondern 5 mg AMT-IgG jede Woche injiziert. Als dieses Tier nach 120 Tagen an einem Peritonealabszeß starb,

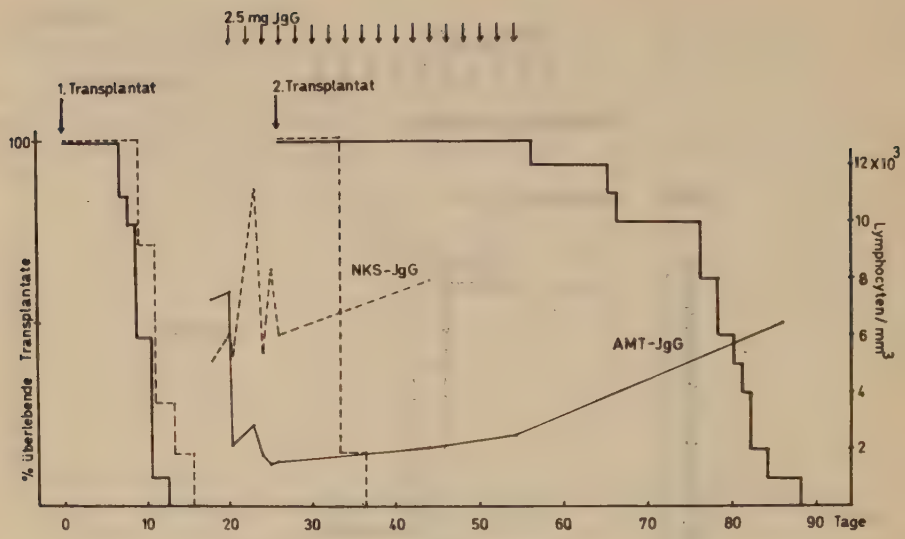


FIG. 5. Wirkung des AMT-IgG auf die "second set rejection" (Hauttransplantate von C57/Bl auf NMRI) und auf die Zahl der peripheren Lymphozyten.
NKS-IgG = 7 Tiere, AMT-IgG = 13 Tiere.

war das Transplantat noch vollkommen intakt. Abb.3 zeigt diese Maus 104 Tage nach der Transplantation. Die dunkel pigmentierten Haare des Transplantates stehen dicht und sind wieder zur vollen Länge ausgewachsen.

Ein zweiter Versuch, dessen Ergebnisse in Fig.4 dargestellt sind, diente der Prüfung, ob das AMT-IgG seine immunosuppressive Wirkung auch dann entfalten kann, wenn es erst nach dem Antigen gegeben wird und somit erst in den efferenten Schenkel der Immunreaktion eingreifen kann. Dazu erhielten die Mäuse in Gruppen von je 6 Tieren alle 2 Tage je 2,5 mg IgG, doch wurde mit der Injektion erst 3 Tage nach der Transplantation begonnen. Die "mittlere Über-

lebenszeit" betrug für die mit NKS-IgG behandelten Tiere 14 Tage, für die mit AMT-IgG behandelten 16 Tage. Daraus ergibt sich, daß das AMT-IgG die Elimination eines Antigens nicht wesentlich verzögert, wenn es erst nach dem Antigen eingeführt wird.

In einem dritten Versuch wurde die Immunosuppression durch das AMT-IgG beim bereits sensibilisierten Tier untersucht (Fig.5). Dazu wurde die sog. "secondset allograft rejection response"nach MEDAWAR (40) verwendet. Überträgt man auf ein Tier 14 Tage nach der Abstoßung eines ersten allogenen Transplantates ein zweites vom gleichen Spendertier, so wird dieses wesentlich früher abgestoßen als das erste, bei H-2-Inkompatibilität meist schon am 6. oder 7. Tag nach der Transplantation. Bei diesem Versuch wurde zugleich die Zahl der peripheren Lymphozyten bestimmt, um einen möglichen zeitlichen Zusammenhang zwischen dem Eintritt der Abstoßung und dem Anstieg der Lymphozyten festzustellen. Die Abstoßung der ersten Transplantate erfolgte zwischen dem 7. und 15.Tag, die "mittlere Überlebenszeit" betrug 10 Tage. Am 20.Tag nach der ersten Transplantation, das sind im Mittel 10 Tage nach der ersten Abstoßung, wurde mit der Injektion von IgG begonnen: Während 34 Tagen erhielten 13 Tiere jeden 3.Tag je 2,5 mg AMT-IgG und 7 Kontrolltiere je 2,5 mg NKS-IgG als intraperitoneale Injektion. 14 Tage nach Abstoßung des ersten Transplantates erfolgte die zweite Transplantation. Die "mittlere Überlebenszeit" betrug bei den mit NKS-IgG behandelten Tieren 7 Tage,

bei den mit AMT-IgG behandelten 54 Tage. Unter NKS-IgG-Behandlung bewegte sich die Zahl der peripheren Lymphozyten im normalen Bereich zwischen 4000 und 12000/mm^3, während sie unter AMT-IgG im Mittel um 2000/mm^3 schwankte und bei keinem Tier mehr als 4000/mm^3 betrug. Schon 2 Tage nach Absetzen der AMT-IgG-Injektionen begann bei einigen Tieren die Abstoßung der Transplantate, zugleich stieg auch die Zahl der peripheren Lymphozyten an. Sie erreichte ihren Normalwert ungefähr zu dem Zeitpunkt, als die Hälfte der Tiere ihr Transplantat abgestoßen hatte.

Um festzustellen, welchen Einfluß eine sofort nach der Geburt einsetzende Behandlung mit AMT-IgG auf die Ausbildung der immunologischen Abwehr bei der jungen Maus hat, wurde in einem 4. Versuch NMRI-Mäusen von Geburt an fast zwei Monate lang AMT- bzw. NKS-IgG nach folgendem Schema intraperitoneal injiziert: eine erste Injektion von 0,1 mg IgG erfolgte nach der oben für die "graft versus host reaction" angegebenen Methode innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt, am folgenden Tag erhielten die Tiere ebenfalls 0,1 mg, 2 Tage später 0,2 mg, darauf für eine Woche alle 3 Tage je 0,3 mg und schließlich jeden 3. Tag 1 mg IgG. 3 Tage nach der letzten Injektion, im Alter von 59 Tagen, wurden den Tieren Hautstücke von 6 Wochen alten C57/Bl-Mäusen übertragen. Fig.6 gibt die Ergebnisse wieder. Die mit NKS-IgG behandelten 7 Kontrolltiere zeigten eine "mittlere Überlebenszeit" von 9 Tagen, während die 7 mit AMT-IgG behandelten Mäuse

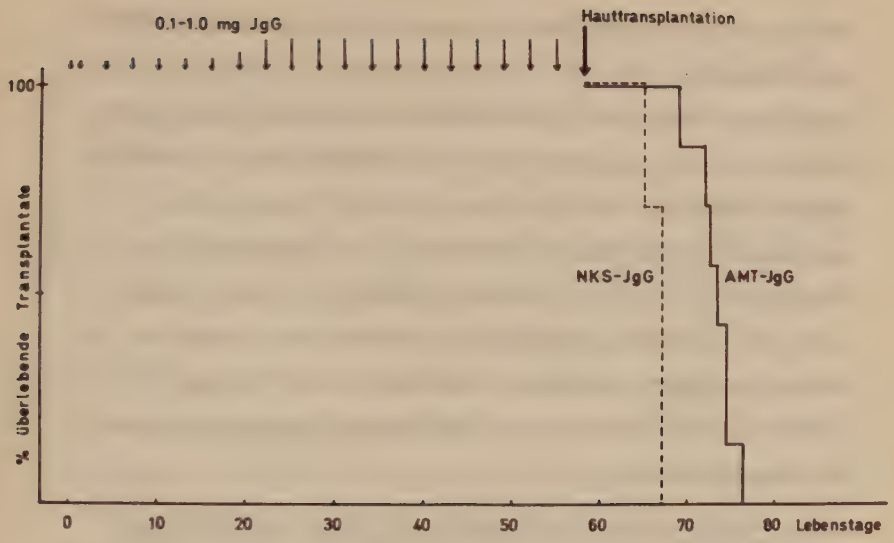


FIG. 6. Wirkung der sofort nach der Geburt einsetzenden und längere Zeit andauernden Behandlung mit AMT-IgG auf die Überlebenszeit von allogenen Transplantaten (C57/Bl auf NMRI). NKS = 7 Tiere, AMT-IgG = 7 Tiere.

eine solche von 16 Tagen aufwiesen. Das Körpergewicht war mit 18 ± 6 gr im Mittel bei den mit AMT-IgG behandelten Tieren geringer als bei den Kontrolltieren, die im Mittel 28 ± 2 gr wogen. Die periphere Lymphozytenzahl betrug zu Beginn der Transplantation nach der AMT-IgG-Behandlung 2200 ± 1200/mm^3, bei den Kontrolltieren 6500 ± 3000/mm^3. Bei den mit AMT-IgG behandelten Tieren wurde das Transplantat nicht wie bei den Kontrolltieren innerhalb kurzer Zeit nekrotisch, sondern es nahm langsam an Umfang ab und schien bis zum Ende der sehr protrahiert verlaufenden Abstoßung im Zentrum noch intakt

zu sein. Diesen Ergebnissen kann entnommen werden, daß die Behandlung mit AMT-IgG nur dann den vollen Erfolg zeigt, wenn sie auch während des Einwirkens eines Antigens durchgeführt wird. Weiterhin sieht man, daß die sofort nach der Geburt einsetzende und längere Zeit andauernde Behandlung mit AMT-IgG die Ausbildung von solchen Zellen nicht verhindern kann, die eine immunologische Reaktion einzugehen vermögen, wenn auch das etwas verzögerte Einsetzen und der blande Verlauf der Abstoßung auf eine gewisse Beeinträchtigung des Abwehrsystems hindeuten.

B 2) "Graft versus host reaction" unter AMT-IgG Behandlung:

Die "graft versus host reaction" kann nach SIMONSEN (62) als Modell einer zellulären Autoimmunerkrankung angesehen werden. Um die Wirkung des AMT-IgG auf diese Reaktion zu untersuchen, wurden neugeborenen Mäusen der Kreuzung (NMRI x C57/Bl) F_1 innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Geburt je 4 x 10^7 Milzzellen einer 6 Wochen alten NMRI-Maus intraperitoneal injiziert. Eine Gruppe von 8 Tieren erhielt alle 2 Tage beginnend mit dem Tag der Geburt je 0,5 mg AMT-IgG pro Tier. Die erste Injektion erfolgte 6 Stunden nach der Implantation der Milzzellen. Eine Kontrollgruppe von ebenfalls 8 Tieren erhielt nach dem gleichen Muster jeweils 0,5 mg NKS-IgG. Weiterhin bekamen nach demselben Schema 8 Tiere

nur NKS-IgG, weitere 8 Tiere nur AMT-IgG, und als letzte Gruppe blieben 8 Tiere ohne Injektion. Mit 9 Tagen wurden die Tiere getötet und das Gewicht von Milz und Nieren bestimmt. Nach SIMONSEN (62) gilt neben der "runt disease", die im Grad ihrer Ausbildung nur schwer beurteilt werden kann, der sogenannte "Milzindex" (MI)als bestes Maß für die Stärke einer "graft versus host reaction". Man erhält ihn dadurch, daß man das 'relative Milzgewicht' des Versuchstieres durch das mittlere 'relative Milzgewicht' von Geschwisterkontrolltieren dividiert. Das 'relative Milzgewicht' wurde durch Division des Milzgewichtes durch das Mittel aus den beiden Nierengewichten des jeweiligen Versuchstieres ermittelt, da das Nierengewicht während der Entwicklung einer "graft versus host reaction" beim jungen Tier im Vergleich zum Körpergewicht eine relativ konstante Bezugsgröße darstellt. Tab. 3 gibt die 'relativen Milzgewichte' und die einzelnen Milzindices der Versuchstiere wieder. Nach SIMONSEN (62) sowie WOODRUFF und ZEISS (71) ist ein Milzindex von mehr als 1,30 als signifikant erhöht zu betrachten und zeigt eine ablaufende "graft versus host reaction" an. Die Injektion von AMT-IgG oder NKS-IgG allein führte im Gegensatz zu den Beobachtungen von LEVEY und MEDAWAR (37) zu keiner signifikanten Milzvergrößerung, wie die mittleren Milzindices von 1,08 bzw.1,14 zeigen, und kann damit keine "graft versus host reaction" vortäuschen. Unter NKS-IgG-Behandlung verursachten die Milzzellen des einen Elternteils bei den F_1-Hybriden eine

starke "graft versus host reaction" mit einem mittleren MI von 2,60, während eine solche unter AMT-IgG-Behandlung beträchtlich abgeschwächt war, wie der mittlere MI von 1,50 anzeigt.

TABELLE 3. Relative Milzgewichte (rel.MG) und Milzindices (MI) bei der 'graft versus host reaction' in neugeborenen Mäusen der Kreuzung (NMRI x C57/Bl) F_1 nach Injektion von Milzzellen einer erwachsenen NMRI-Maus unter Behandlung mit AMT-IgG und NKS-IgG.

Behandlung:	Keine Zellen, kein IgG	Nur NKS-IgG a)		Nur AMT-IgG		NKS-IgG + Milzzellen b)		AMT-IgG + Milzzellen	
Tier Nr.	rel.MG	rel.MG	MI	rel.MG	MI	rel.MG	MI	rel.MG	MI
1	0,85	1,03	1,21	0,91	1,07	2,1	2,47	1,05	1,2
2	0,58	0,98	1,15	0,92	1,08	2,5	2,94	1,30	1,5
3	0,90	0,94	1,10	1,06	1,25	3,2	3,76	1,32	1,5
4	0,93	1,01	1,19	0,93	1,09	2,2	2,59	1,60	1,8
5	1,06	0,87	1,02	0,96	1,13	2,2	2,59	0,95	1,1
6	0,76	0,96	1,13	0,96	1,13	2,0	2,35	1,01	1,1
7	0,85	0,97	1,14	0,79	0,93	1,7	2,00	1,52	1,7
8	0,87	1,03	1,21	0,80	0,94	1,8	2,12	1,48	1,7
Mittlerer MI:			1,14		1,08		2,60		1,5

Das mittlere relative Milzgewicht der Kontrolltiere beträgt 0,85.

a) Jedem Tier wurden 4 x je 0,5 mg IgG alle 2 Tage injiziert.
b) Jedes Tier erhielt 6 Stunden vor der ersten IgG-Injektion 4×10^7 Milzzellen.

B 3) Wirkung des AMT-IgG auf die durch Bordetella pertussis induzierte Lymphozytose:

Eine intravenöse Injektion von Bordetella pertussis-Keimen bewirkt bei der Maus eine massive Erhöhung der peripheren Lymphozytenzahl, die nach MORSE und RIESTER(48)

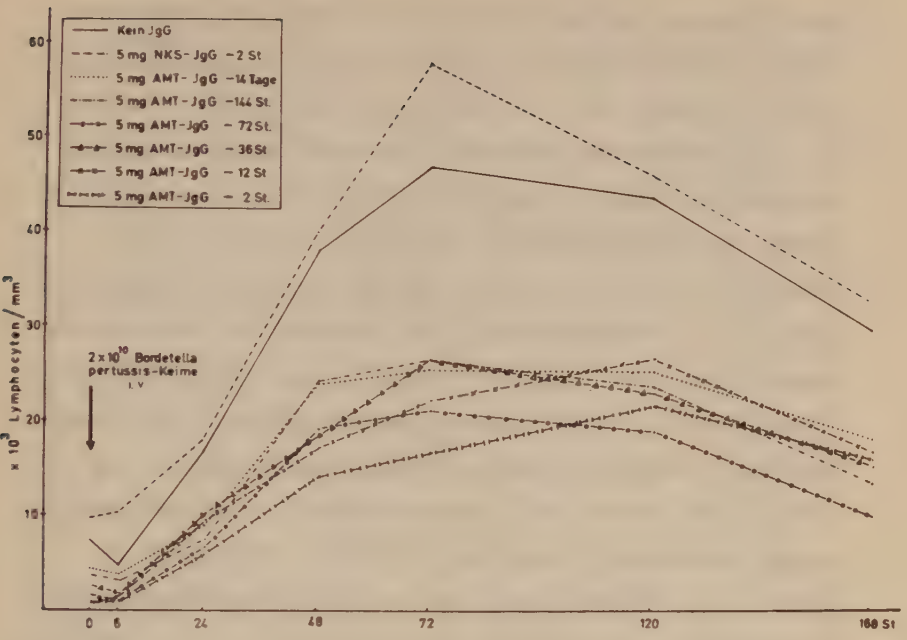


FIG. 7. Wirkung einer in verschiedenen zeitlichen Abständen vorausgehenden Injektion von AMT-IgG auf die durch Bordetella pertussis-Keime induzierte Lymphozytose. Jeder Punkt stellt den mittleren Wert aus den Lymphozytenzahlen von 6 Versuchstieren dar.

nicht durch eine verstärkte Proliferation, sondern durch einen vermehrten Austritt dieser Zellen aus den Speicherorganen des lymphatischen Systems in die Blutbahn und durch die Verhinderung ihrer Rezirkulation bedingt sein soll. Es zeigte sich, daß dieser Lymphozytenanstieg durch eine Injektion von AMT-IgG gebremst werden kann. 14 Tage sowie 144, 72, 36, 12 und 2 Stunden vor der Injektion von 2 x 10^{10} Bordetella pertussis-Keimen erhielten NMRI-Mäuse in Gruppen von je 6 Tieren 5 mg AMT-IgG pro Tier

als einmalige intraperitoneale Injektion. Die periphere Lymphozytenzahl wurde kurz vor sowie 6, 24, 48, 72, 120 und 168 Stunden nach der Bordetella-Inokulation bestimmt. Eine Gruppe von Kontrolltieren erhielt 2 Stunden vor der Bordetella-Injektion 5 mg NKS-IgG pro Tier, einer anderen wurden nur Pertussis-Keime injiziert. Aus Fig.7 und Tabelle 4 kann man erkennen, daß die peripheren Lymphozyten schon 24 Stunden nach der Injektion der Keime stark angestiegen waren und nach 72 Stunden den höchsten Wert erreichten, um dann langsam wieder abzufallen. Fig.7 und Tabelle 4 zeigen, daß eine vorhergehende Injektion von AMT-IgG den Anstieg der peripheren zirkulierenden Lymphozyten verringerte, wobei die Injektion von AMT-IgG 14 Tage vor der Verabreichung von Bordetella pertussis noch die gleiche lymphopenische Wirkung zeigte wie die AMT-IgG-Injektion unmittelbar vor dem Antigen-Stimulus. Das würde bedeuten, daß eine einmalige Injektion von AMT-IgG noch nach 14 Tagen den Ausstrom der Lymphozyten in die Blutbahn oder ihre Rezirkulation wirkungsvoll behindern kann. Die Lymphozyten stiegen bei den mit AMT-IgG behandelten Tieren nur auf ungefähr die Hälfte des Wertes an, der bei den Kontrolltieren erreicht wurde. Tabelle 5 zeigt, daß der prozentuale Anteil der Lymphozyten an der Zahl der Gesamtleukozyten bei den mit AMT-IgG behandelten Mäusen während des ganzen Versuchs deutlich geringer war als bei den Kontrolltieren. Auffallend niedrig war der Anteil der Lymphozyten 6 Stunden nach Injektion der Bordetella-Keime bei den Tieren mit AMT-IgG-Behandlung.

TABELLE 4. Wirkung einer in verschiedenen zeitlichen Abständen vorausgehenden Injektion von AMT-IgG auf den durch Bordetella pertussis-Keime induzierten Anstieg der peripheren Lymphozyten in der Maus.

	0*	6*	24*	48*	72*	120*	168*
Kein IgG	7.5[a] (4.5-13.0)[b]	4.8 (3.0-12.0)	17.2 (9.0-35.5)	38.0 (25.0-52.0)	47.0 (26.0-67.0)	44.0 (21.0-65.0)	30.0 (20.0-41.0)
5 mg NKS-IgG - 2 St.	9.8 (4.4-14.4)	10.4 (7.2-18.7)	18.2 (7.9-29.5)	40.0 (38.5-76.0)	58.0 (38.0-87.0)	46.5 (32.0-69.0)	33.0 (15.0-42.0)
5 mg AMT-IgG - 14 T.	4.4 (2.7-7.0)	3.9 (1.0-6.0)	9.0 (3.0-16.0)	24.0 (19.0-32.0)	25.7 (15.0-38.0)	25.6 (8.0-40.0)	18.5 (12.0-22.0)
5 mg AMT-IgG -144St.	4.0 (1.4-5.5)	3.4 (1.0-9.0)	7.9 (4.5-12.0)	24.6 (15.0-38.0)	26.8 (14.0-45.0)	24.2 (18.0-29.0)	13.7 (10.0-16.0)
5 mg AMT-IgG -72 St.	1.8 (0.5-5.0)	1.2 (0.5-2.6)	6.9 (4.0-10.0)	19.4 (8.0-39.0)	21.5 (15.0-32.0)	19.4 (14.0-29.0)	10.5 (6.0-15.0)
5 mg AMT-IgG -36 St.	3.0 (1.0-7.2)	2.2 (0.6-6.7)	10.7 (6.3-18.8)	19.3 (9.5-38.0)	26.6 (18.0-37.0)	23.6 (15.0-32.0)	15.5 (11.0-25.0)
5 mg AMT-IgG -12 St.	0.9 (0.2-2.8)	1.8 (1.3-2.7)	9.7 (4.0-18.6)	17.6 (8.5-24.5)	22.5 (17.5-25.0)	27.0 (19.0-34.5)	17.3 (14.0-22.0)
5 mg AMT-IgG - 2 St.	1.3 (0.3-2.5)	1.6 (0.2-3.2)	7.5 (2.3-18.0)	14.5 (5.4-30.0)	17.0 (5.5-25.5)	22.2 (12.0-33.0)	16.2 (11.0-23.0)

a) Die Zahlen ohne Klammern geben den Mittelwert aus den peripheren Lymphozytenzahlen von den 6 Tieren einer Gruppe in 1000/mm^3 an.

b) Die Zahlen in Klammern bedeuten den jeweils höchsten und niedrigsten Lymphozytenwert aus einer Gruppe von 6 Versuchstieren in 1000/mm^3.

* = Stunden nach Bordetella-Injektion.

TABELLE 5. Einfluß des AMT-IgG auf das Verhältnis von Lymphozyten und Granulozyten bei der durch Bordetella pertussis induzierten Lymphozytose in der Maus.

Stunden nach Bordetella-injektion: / Behandlung:	0	6	24	48	72	120	168
Kein IgG	90[a)]	53	58	72	81	75	72
5 mg NKS-IgG - 2 St.	71	49	62	78	72	78	69
5 mg AMT-IgG - 14 Tage	70	23	33	52	64	62	66
5 mg AMT-IgG -144 St.	42	22	27	29	47	70	69
5 mg AMT-IgG - 72 St.	39	11	10	23	31	53	59
5 mg AMT-IgG - 36 St.	48	13	32	23	22	26	6
5 mg AMT-IgG - 12 St.	41	19	42	34	38	28	40
5 mg AMT-IgG - 2 St.	29	20	44	29	27	31	39

a) Die Zahlen geben den Anteil der Lymphozyten in % der Gesamtleukozyten im peripheren Blut an. Jede Zahl bedeutet den Mittelwert aus 6 Einzelwerten.

B 4) Histologische Veränderungen unter kurzzeitiger Behandlung mit AMT-IgG:

Es erschien interessant, histologisch die allogenen Transplantate zu untersuchen, die unter der Behandlung mit AMT-IgG makroskopisch eine vollkommen normale Funktion in bezug auf das Haarwachstum zeigten und dabei gleichzeitig nach Veränderungen in den lymphatischen Organen der behandelten Tiere zu suchen. In einer vergleichenden Studie wurde einer Gruppe von 6 Wochen

alten NMRI-Mäusen jeden 2. Tag 2,5 mg AMT-IgG, einer Kontrollgruppe je 2,5 mg NKS-IgG intraperitoneal injiziert. Drei Tage nach der ersten Injektion erhielten alle Versuchstiere ein Hauttransplantat von C57/Bl-Mäusen. Vom 4. bis zum 12. Tag nach der Transplantation wurde jeden Tag ein Tier aus jeder Gruppe getötet und wurden histologische Präparate von Transplantat, von Milz, Thymus sowie von axillären Lymphknoten angefertigt. Die Abbildungen 4 und 5 zeigen Schnitte durch die Milz von 2 Mäusen, die in 10 Tagen insgesamt 15 mg AMT- bzw. NKS-IgG erhalten hatten. Die Abbildungen 6 und 7 geben Schnitte durch den Thymus und die Abbildungen 8 und 9 Schnitte durch den Randbereich eines axillären Lymphknotens bei denselben Tieren wieder. In Milz und Thymus, zwei zentralen Organen des lymphatischen Systems, kann man keinen deutlichen Unterschied hinsichtlich des Gehalts an Lymphozyten zwischen den beiden Tieren feststellen; im peripheren Lymphknoten jedoch findet man bei dem mit AMT-IgG behandelten Tier im Vergleich zum Kontrolltier eine auffallende Verarmung an kleinen Lymphozyten bei gleichzeitiger Zunahme der sog. "großen pyroninophilen Zellen". Die Abbildungen 10 und 11 zeigen die Grenze zwischen Wirtsgewebe und allogenem Transplantat am 6. Tag nach der Transplantation. Die Tiere hatten bis dahin insgesamt 12,5 mg AMT- bzw.NKS-IgG erhalten. Bei dem mit NKS-IgG behandelten Tier läßt der deutliche Demarkationswall sowie der Austritt von

Erythrozyten und die Einwanderung von Entzündungszellen in das transplantierte Gewebe den Beginn der Abstoßungsreaktion erkennen. Die mit AMT-IgG behandelte Maus zeigt zu diesem Zeitpunkt nur eine vergleichsweise geringe zelluläre Reaktion an der Grenze zwischen Wirt und Transplantat. Abbildung 12 zeigt den Übergang zwischen dem Wirtsgewebe eines mit insgesamt 20 mg AMT-IgG behandelten Tieres und dem allogenen Transplantat am 12. Tag nach der Transplantation. Die Grenze zwischen beiden Geweben ist nur noch an der verschieden starken Pigmentierung der Haarwurzeln von Wirt und Spender und dem subepidermal sichtbaren Narbengewebe zu erkennen.

IV) D I S K U S S I O N.

Bei dem verwendeten Kaninchen-Anti-Maus-Serum ließ sich die aktive Fraktion im Bereich der IgG-Globuline nachweisen. Das AMT-IgG wirkte in vitro agglutinierend und zytotoxisch auf die Lymphozyten. Auf deren Oberfläche konnte es nach Inkubation in vitro mit Hilfe der Fluoreszenztechnik nachgewiesen werden. Im peripheren Blut und im Lymphknoten bewirkte es eine deutliche Abnahme der kleinen Lymphozyten, jedoch nicht in Milz und Thymus. Seine ausgeprägte immunosuppressive Wirkung zeigte sich darin, daß es die Abstoßung von allogenen Transplantaten stark verzögerte und die "graft versus host reaction" beträchtlich abschwächte. Diese Wirkung fand sich jedoch nur dann, wenn die Behandlung mit AMT-IgG schon einsetzte, bevor das Abwehrsystem des Versuchstieres mit dem eingeführten Antigen in Berührung gekommen war.

Es soll nun im Zusammenhang mit einer kurzen Darstellung der wichtigsten zur Zeit diskutierten Theorien über die Wirkungsweise des ALS gezeigt werden, inwieweit die einzelnen Deutungsmöglichkeiten durch die hier gewonnenen Versuchsergebnisse gestützt oder in Frage gestellt werden können.

Die nächstliegende Erklärung beruht auf der Annahme, daß das ALS die Lymphozyten unter Mitwirkung von Komplement zerstört und dadurch die Zahl der potentiell auf

ein Antigen reagierenden Zellen reduziert. Dafür spricht:

a) Die von den meisten Autoren beobachtete zytotoxische Wirkung des ALS auf Lymphozyten in vitro nach Zugabe von Komplement (44, 54, 25).

b) Der Abfall der peripheren Lymphozyten und die gleichzeitig histologisch nachgewiesene Abnahme der kleinen Lymphozyten im peripheren lymphatischen Gewebe, die auch von GRAY und MONACO (25) sowie von TURK und WILLOUGHBY (67) beschrieben werden. Letztere finden jedoch auch in der Thymusrinde eine deutliche Abnahme der Lymphozyten, wie sie bei den hier beschriebenen Präparaten nicht festgestellt werden kann (S. 33, Abb. 6 und 7, S.51).

c) Eine Vermehrung der blastoiden Zellen in den lymphatischen Organen, wie man sie als Reaktion auf eine rasche Entfernung der Lymphozyten aus dem Körper z.B. durch Drainage des ductus thoracicus beobachten kann. Nach MERRITT (42) könnte sie als Folge einer Stimulation durch die aus den zerstörten Lymphozyten freiwerdende DNS gedeutet werden.

d) Die von THOMPSON (66) beschriebene Bindung von Komplement durch das ALS, wenn es mit Lymphozyten zusammengebracht wird.

e) Der von RIETHMÜLLER et al. (58, 59) sowie von WOODRUFF et al. (73) mitgeteilte Befund, daß die Antilymphozytenglobuline, die infolge Abdauung ihres Fc-Fragmentes kein Komplement mehr binden können, weder in vitro einen zytotoxischen noch in vivo einen immunosuppressiven Effekt

haben, obgleich sie auf Grund ihres nicht zerstörten bivalenten Charakters die Lymphozyten noch agglutinieren.

f) Die vor kurzem von RIETHMÜLLER (57) mitgeteilte Beobachtung, daß ein gegen Mauslymphozyten gerichtetes Antiserum von der Ente, das, wie es von Vogel-IgG-Globulinen bekannt ist, Säugetierkomplement nicht meßbar bindet, bei Mäusen keinen Abfall der peripheren Lymphozyten und keine Verzögerung der Abstoßung von allogenen Hauttransplantaten bewirkt.

Diese Befunde machen es sehr wahrscheinlich, daß die immunosuppressive Wirkung des ALS zu einem großen Teil auf der vom Komplement abhängigen Zerstörung der Lymphozyten beruht. Doch kann dies für eine Erklärung allein nicht ausreichen, da man z.B. nach den Untersuchungen von Mc GREGOR (39) und H.PICHLMAIER (55) durch eine Dauerdrainage des ductus thoracicus eine wesentlich stärkere Senkung der Gesamtlymphozytenzahl im Organismus erhalten kann, ohne jedoch damit eine der ALS-Wirkung vergleichbare Beeinträchtigung der immunologischen Abwehrfunktionen zu erreichen. Auch ist noch umstritten, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Senkung der peripheren Lymphozytenzahl und der verminderten immunologischen Reaktivität besteht. Zwar finden MONACO et al. (47) die Abstoßung von homologen Transplantaten immer mit einem Wiederanstieg der Lymphozytenzahlen auf Normalwerte verbunden, und auch die hier beschriebenen Ergebnisse lassen sich in dieser Richtung deuten; andere Autoren jedoch wie z.B. WOODRUFF und ANDERSON (72),

ABAZA (1), LEVEY und MEDAWAR (35,37), sowie IWASAKI (32) beschreiben ein Überleben von Homotransplantaten nach ALS-Behandlung lange Zeit über die Restitution der normalen Lymphozytenzahl hinaus. BALNER (4) zufolge zeigten Affen unter ALS nach einer anfänglichen leichten Lymphopenie bald eine Wiederherstellung der normalen Lymphozytenzahl trotz Weiterführung der ALS-Behandlung mit erfolgreicher Immunosuppression. IWASAKI und PORTER (32) berichten über die verzögerte Abstoßung von Lebertransplantaten bei Hunden, die mit so wenig ALS behandelt wurden, daß man bei ihnen überhaupt keine Lymphopenie beobachten konnte.

Es ist auch möglich, daß das ALS die Lymphozyten nicht unbedingt zerstört, sondern sie nur in ihrer Beweglichkeit innerhalb des Organismus behindert. Dafür spricht z.B. die geringe Zahl von Rundzellen, die im histologischen Präparat um ein Homotransplantat in einem mit ALS behandelten Tier gefunden werden (S.34). Im Gegensatz dazu beschreibt jedoch TAUB (65) einen starken Rundzellenwall um jedes homologe Transplantat sowohl ohne als auch mit ALS-Behandlung, und zwar auch dann, wenn das Transplantat sonst vollkommen intakt zu sein scheint. Als weiterer Hinweis auf eine eingeschränkte Bewegungsfähigkeit der Lymphozyten unter ALS-Behandlung könnte die Beobachtung gewertet werden, daß eine Inokulation von Bordetella pertussis-Keimen, die nach MORSE(48) nur eine Ausschwemmung der Lymphozyten in das periphere Blut bewirken soll, nach einer Injektion von ALS zu

einem geringeren Lymphozytenanstieg führt als beim unbehandelten Kontrolltier.

Als weitere Möglichkeit einer Erklärung der ALS-Wirkung haben LEVEY und MEDAWAR (36) die "blindfolding hypothesis" angeführt. Danach werden die Lymphozyten auf ihrer Oberfläche von den ALS-Globulinen dergestalt besetzt, daß ihre Fähigkeit, ein Antigen entweder zu erkennen oder es zu eliminieren oder beides zugleich, stark eingeschränkt ist. Die beiden Autoren stützen diese Theorie durch die Feststellung, daß die Lymphozyten von ALS-behandelten Tieren keine "graft versus host reaction" mehr eingehen können (37), was durch die Befunde von BOAK u.a. (9) bestätigt wird. Weiterhin spricht für diese Hypothese die schon erwähnte Beobachtung von TAUB (65), daß sich - im Gegensatz zu den hier dokumentierten Befunden - auch unter ALS-Behandlung eine Menge von Lymphozyten um das Homotransplantat ansammeln, ohne es jedoch wie beim Kontrolltier zerstören zu können. Nach GOWANS (24)könnte noch folgende Möglichkeit diskutiert werden: Er nimmt an, daß die Fähigkeit des Lymphozyten, durch den Lymphknoten zu zirkulieren, auf einer spezifischen Wechselwirkung zwischen seiner Oberfläche und dem Endothel der Lymphknotenvenolen beruhen muß. Die betreffenden Stellen auf der Oberfläche des Lymphozyten könnten nun von den ALS-Globulinen so bedeckt werden, daß dieser daran gehindert wird, die zur Induktion und Regulation der

immunologischen Reaktion wichtigen Stellen im lymphatischen Gewebe zu erreichen.

Gegen die "blindfolding hypothesis" führen LEVEY und MEDAWAR (37) selbst eigene Untersuchungen an, die zeigen, daß auch die Tochtergenerationen der aus ALS-behandelten Tieren stammenden Lymphozyten in der Ausführung einer "graft versus host reaction" noch stark beeinträchtigt sind. Weiterhin sollte man annehmen, daß das $F(ab')_2$-Fragment des Antilymphozytenglobulins noch zu einem "blindfolding" fähig ist und damit zu einer Herabsetzung der immunologischen Reaktivität führen kann, was aber in den von RIETHMÜLLER (59) beschriebenen Versuchen nicht nachgewiesen werden konnte.

In der Diskussion über die Wirkungsweise des ALS befindet sich weiterhin die Theorie der "sterile activation" von LEVEY und MEDAWAR (35), worunter sie die Anregung der kleinen Lymphozyten zur blastoiden Transformation durch ALS verstehen, jedoch ohne daß sich daran eine spezifische Antikörperbildung anschließt, ähnlich wie dies bei der Stimulation durch PHA der Fall ist. Für diese Theorie spricht die von LEVEY und MEDAWAR (35) beobachtete Hyperplasie des lymphatischen Systems sowie die hier (S. 33) für die Maus und von TURK und WILLOUGHBY (67) beim Meerschweinchen beschriebene Zunahme der "großen pyroninophilen Zellen" bei gleichzeitiger Abnahme der kleinen Lymphozyten im peripheren Lymphknoten unter der Behandlung mit ALS.

Da man eine Transformation des kleinen Lymphozyten auch durch Zufuhr eines starken Antigens erreichen kann, gewinnt der hier (S.33) und anderweitig dokumentierte (5) Befund an Bedeutung, daß auch die als schwaches Antigen wirkende reine ALS-IgG-Fraktion zu einer Zunahme der großen pyroninophilen Zellen im lymphatischen Gewebe führt. FRIES et al. (21) fanden in einer mit ALS inkubierten Lymphozytenkultur mit dem Elektronenmikroskop eine Umwandlung der Zellfeinstruktur in Richtung auf den Lymphoblasten. Nach RIETHMÜLLER et al. (60) jedoch führt auch das in vivo unwirksame $F(ab')_2$-Fragment des ALS-IgG beim Lymphozyten in vitro zu einer Steigerung der Uridinaufnahme, wie man sie allgemein bei der Transformation in blastoide Zellen findet.

Die Möglichkeit, daß das ALS als konkurrierendes Antigen kompetitiv die Bildung von Antikörpern gegen andere Antigene hemmt, wird von einigen Autoren wie z.B. WOODRUFF befürwortet. Obwohl reines IgG im allgemeinen als schwaches Antigen gilt, gelingt es mit IgG vom Kaninchen doch relativ gut, bei der Maus eine immunologische Paralyse zu erzeugen (41). HALPERN und LIACOPOULOS (27) zufolge kann man mit hohen Dosen von heterologem IgG sogar die Abstoßung eines allogenen Transplantats verhindern. Nach LAWRENCE und SIMONSEN (34) sowie nach WEIGLE und HIGH (69) ist die sog. "antigenic competition" umso ausgeprägter, je stärker das konkurrierende Antigen ist. Ersteren zufolge steht die Stärke des Antigens

wiederum in einem direkten Verhältnis zu der Zahl der Zellen, die es primär erkennen und darauf reagieren können. Wenn nun die Annahme zutrifft, daß diese primär erkennenden Zellen vor allem auf solche Antigene reagieren, zu denen sie komplementäre Strukturen auf ihrer Oberfläche besitzen, dann müßten sehr viele von ihnen mit dem ALS reagieren, da dieses als Antikörper gegen eine große Lymphozytenpopulation und damit gegen eine Vielzahl verschiedener Oberflächenstrukturen hergestellt wird. Das würde bedeuten, daß das ALS nach der Theorie von LAWRENCE und SIMONSEN ein sehr starkes Antigen wäre und damit auch in geringer Konzentration noch eine 'antigenic competition' bewirken würde. Es wurde deshalb versucht, Mäuse gegen ALS tolerant zu machen, indem schon kurze Zeit nach ihrer Geburt mit der Injektion von ALS begonnen wurde. Wie oben dargestellt, zeigten diese Tiere nur eine geringe Verlängerung der Überlebenszeit von allogenen Hauttransplantaten nach Behandlung mit ALS; doch kann man hierbei nicht sicher sagen, ob durch die auf solche Weise induzierte Toleranz gegenüber ALS gleichzeitig auch verhindert wird, daß dieses Serum im Sinne der 'antigenic competition' wirkt, da weder das Prinzip der Toleranz noch der 'antigenic competition' auf zellulärer Ebene hinreichend experimentell geklärt worden sind.

Weiterhin wird die Möglichkeit diskutiert, daß das ALS als "enhancing factor" wirkt. Nach KALISS (33)

kann man eine Verlängerung der Überlebenszeit von allogenen Transplantaten dadurch erreichen, daß man gleichzeitig mit der Transplantation ein mit dem Empfänger isogenes, gegen das Gewebe des Sponders gerichtetes Antiserum injiziert. Dieses 'enhancement' kann nach NELSON (50) damit erklärt werden, daß die zusätzlich injizierten Antikörper die Antigenstrukturen auf dem Transplantat abdecken und so für den Wirt unerkennbar machen oder durch einen bestimmten Mechanismus wie z.B. sterische Hinderung den Zellkontakt durch Lymphozyten oder einen Angriff von Anti-Körpern zusammen mit Komplement auf die Zellen des Transplantates verhindern. Eine andere Erklärung dieses Phänomens gründet auf der oben ausgeführten Annahme, daß ein primär gegen ein bestimmtes Antigen reagierender Lymphozyt auf seiner Oberfläche a priori Antikörper-ähnliche Strukturen besitzt, die zu diesem Antigen komplementär sind und es binden können, was eine Transformation des Lymphozyten zur proliferierenden Stammzelle zur Folge haben könnte. Wird nun zugleich mit dem Antigen ein gegen dieses gerichteter isologer Antikörper injiziert, dann könnte dieser mit Antigenen, die gerade an Lymphozyten gebunden wurden, reagieren und so die Transformation dieser Zellen verhindern oder sie in einer Art passiver Autoimmunreaktion mit Hilfe von Komplement zerstören. Dadurch würden spezifisch die Zellen eliminiert, die primär gegen das nun tolerierte Antigen reagieren würden. Diese Erklärung

wird gestützt durch die Untersuchungen von WRIGHT (74) in denen er zeigte, daß die Lymphozyten von einer Maus, in die ein allogener Tumor zugleich mit einem gegen ihn gerichteten isologen Antiserum übertragen wurde, bei Tieren, die isogen sind mit dem Spender des Tumors, keine "graft versus host reaction" eingehen können, während sie eine solche bei anderen homologen Stämmen noch voll auszuführen vermögen. Gegen die Zerstörung der primär reagierenden Zellen beim 'enhancement' spricht auf der anderen Seite der Befund von CHARD et al. (11), daß ein 'enhancement' auch möglich ist, wenn zusammen mit dem Antigen das nicht zytotoxische Fab-Fragment eines gegen dieses gerichteten isologen Antiserums injiziert wird.

Da nun der Lymphozyt viele Antigenstrukturen mit den übrigen Geweben teilt - nach WOODRUFF (70) führen Hauttransplantate als Antigen zu ebenso guten Antiseren gegen Lymphozyten wie die Inokulation dieser Zellen selbst - so wäre es denkbar, daß das ALS als besonders potenter 'enhancing factor' wirkt, indem es sich entweder mit den Histokompatibilitätsantigenen auf dem Transplantat verbindet und so eine Erkennung oder Destruktion durch den Empfänger verzögert oder aber auf die oben dargestellte Weise spezifisch die Lymphozyten eliminiert, die primär auf das Transplantat reagieren können. Für die erste dieser Möglichkeiten spricht die Beobachtung von GUTTMAN et al. (26), daß die Abstoßung von Nieren eines

mit ALS behandelten Spenders in einem unbehandelten Empfänger verzögert ist.

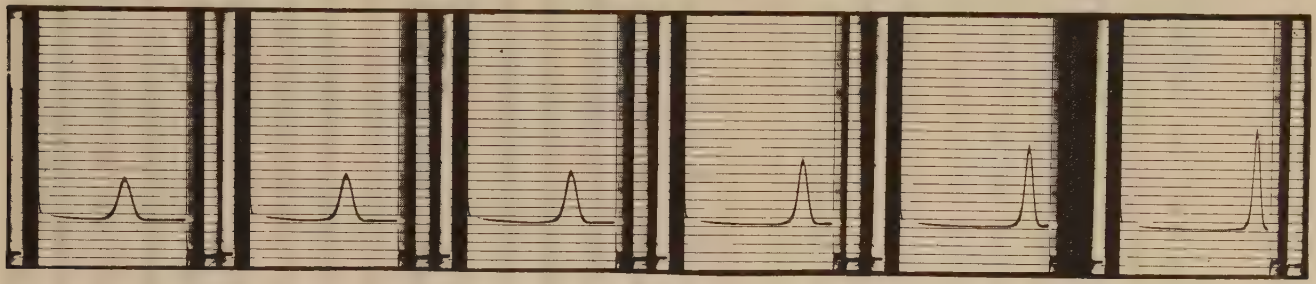
Das Anti-Thymus-Serum könnte auch eine Wirkung gegen Bestandteile des Thymus selbst besitzen, wie z.B. gegen den Lymphozytose-stimulierenden humoralen Thymusfaktor, dessen Existenz durch die Versuche von METCALF (43) sowie OSOBA und MILLER (52) wahrscheinlich gemacht wurde. NAGAYA und SIEKER (49), BALNER (6) sowie FRIEDMAN (20) zufolge hat das Anti-Thymus-Serum einen wesentlich stärkeren immunosuppressiven Effekt als ein gegen Lymphozyten aus dem übrigen lymphatischen Gewebe gerichtetes Antiserum. HINTZ und WEBBER (29) fanden ein injiziertes radioaktives Anti-Thymus-Serum in der höchsten Konzentration von allen Organen im Thymus, während DENMAN et al. (15) ein solches weder mit Hilfe der Immunfluoreszenz noch mit der Autoradiographie im Thymus nachweisen konnten.

Die Frage, ob das ALS den Lymphozyten primär in der Erkennung des Antigens oder in der Weitergabe seiner Information an zentrale Stellen wie Milz oder regionäre Lymphknoten, ob bei seiner spezifischen Stimulation in diesen Organen oder erst bei der Eliminierung des Antigens behindert, kann noch nicht entschieden werden. Daß es wichtig ist, bei der Unterdrückung immunologischer Reaktionen den Lymphozyten in seiner peripheren Aktion zu hemmen, zeigen die Beobachtungen von ELKINS (18) an lokalen "graft versus host" - Reaktionen, wo Lymphozyten auch ohne vorhergehende zentrale Information oder

Stimulierung allogenes Gewebe an Ort und Stelle nur auf Grund eines direkten Kontaktes mit dem Antigen erkennen und zerstören konnten. Daß das ALS eine solche hemmende Wirkung auf die peripheren Lymphozyten besitzt, wird wahrscheinlich gemacht einmal durch die oben schon erwähnte Beobachtung, daß die Lymphozyten von ALS-behandelten Tieren keine "graft versus host reaction" mehr eingehen können (37,9), zum andern dadurch, daß die Antilymphozytenglobuline auch bereits sensitivierte Lymphozyten in der Abstoßung eines Transplantates behindern können, wie die "second set allograft rejection response" unter ALS-Behandlung gezeigt hat. Nach den oben beschriebenen Untersuchungen muß das ALS aber auch in der ersten Phase der immunologischen Reaktion, bei der Erkennung des Antigens, eine hemmende Wirkung haben, da weder bei der Transplantation noch bei der Bestimmung der Plaque bildenden Zellen durch eine erst nach der Einführung des Antigens erfolgende Injektion von ALS eine wesentliche Einschränkung der Abwehrreaktion erreicht wurde. Nach LEVEY und MEDAWAR (35) jedoch ist der immunosuppressorische Effekt des ALS auch dann nicht gemindert, wenn es erst einige Tage nach dem Antigen gegeben wird. RUSSE und CROWLE (61) zufolge zeigen Tiere, die ein Antigen unter ALS-Behandlung erhalten haben, 4 Monate nach Absetzen des ALS eine Hypersensibilitätsreaktion, wenn das betreffende Antigen erneut zugeführt wird. Diesem Befund zufolge würde also das ALS die Erkennung

des Antigens nicht verhindern; doch wäre es auch denkbar, daß das Antigen persistiert und auch dann noch immunogen ist, wenn die Wirkung des ALS bereits abgeklungen ist.

Diese kurze Gegenüberstellung läßt erkennen, daß die zur Zeit vorliegenden experimentellen Befunde zur Wirkungsweise des ALS in ihrer Aussage zum großen Teil noch zu unspezifisch und häufig noch zu widersprüchlich sind, als daß sie heute schon über eine Vielzahl von Interpretationsmöglichkeiten hinaus zu einer Klärung der Faktoren führen könnten, die das Antilymphozytenserum zu einem so wirkungsvollen Immunosuppressivum machen, das sowohl in der Praxis bei der Unterdrückung unerwünschter Abwehrreaktionen neue Möglichkeiten eröffnet hat, als auch in der Theorie gemäß METCHNIKOFF's ursprünglicher Idee bei der Erforschung immunologischer Mechanismen neue Wege weisen kann.



51* 43* 37* 25* 17* 11*

Abb. 1) Schlierendiagramm während der Ultrazentrifugation des AMT-IgG.

* = Minuten nach Erreichen der vollen Umlaufgeschwindigkeit der Zentrifuge.

Abb.2. Lymphozyten einer NMRI-Maus im UV-Licht nach Inkubation mit AMT-IgG und fluoreszierendem Anti-Kaninchen-IgG-Globulin von der Ziege. Die "Ringreaktion" zeigt, daß die markierten IgG-Globuline sich vor allem auf der Oberfläche der Lymphozyten befinden.

1 : 2000

Abb.3. NMRI-Maus mit äußerlich vollkommen intaktem Transplantat von einer C57/Bl-Maus am 104. Tag nach der Transplantation. Das Tier war bis dahin mit insgesamt 80 mg AMT-IgG behandelt.

Abb.4. Schnitt durch die Milz einer Maus, die innerhalb von 10 Tagen insgesamt 15 mg AMT-IgG erhalten hatte. 1 : 65, H.E.

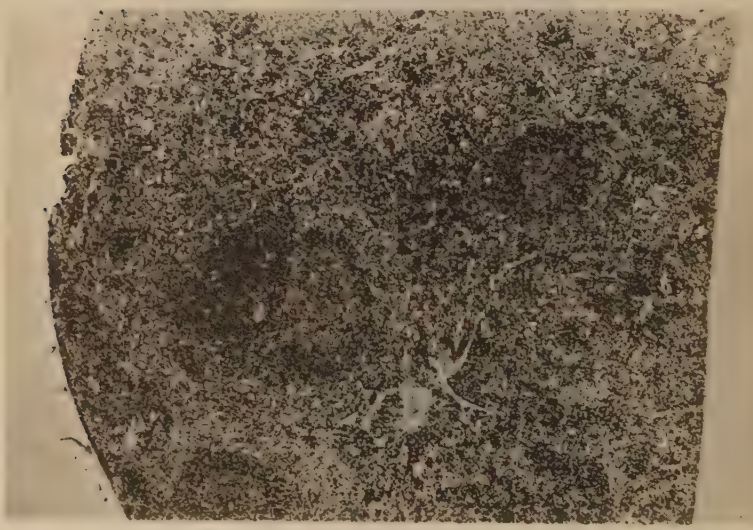


Abb. 5. Schnitt durch die Milz einer Maus, die innerhalb von 10 Tagen insgesamt 15 mg NKS-IgG erhalten hatte. 1 : 65, H.E.

Abb.6. Schnitt durch den Thymus einer Maus. die innerhalb von 10 Tagen 15 mg AMT-IgG erhalten hatte.
1 : 160, H.E.

Abb.7. Schnitt durch den Thymus einer Maus, die innerhalb von 10 Tagen 15 mg NKS-IgG erhalten hatte.
1 : 160, H.E.

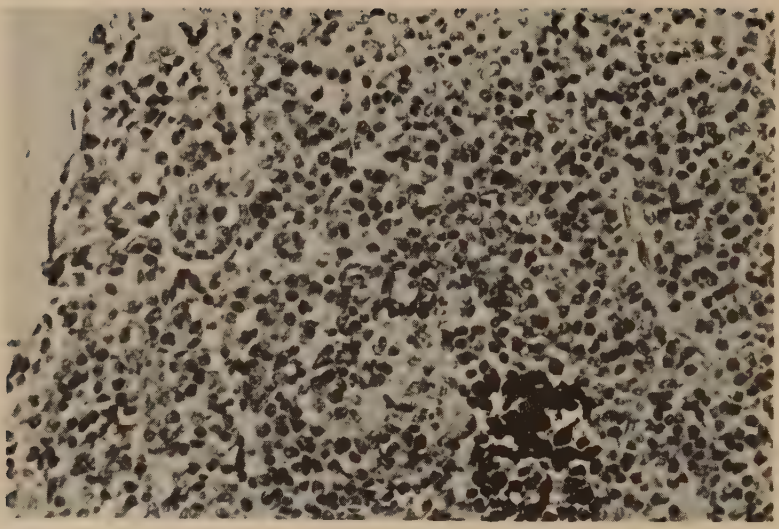


Abb.8. Schnitt durch die Rinde eines axillären Lymphknotens von einer Maus, die in 10 Tagen 15 mg AMT-IgG erhalten hatte. 1 : 400, H.E.

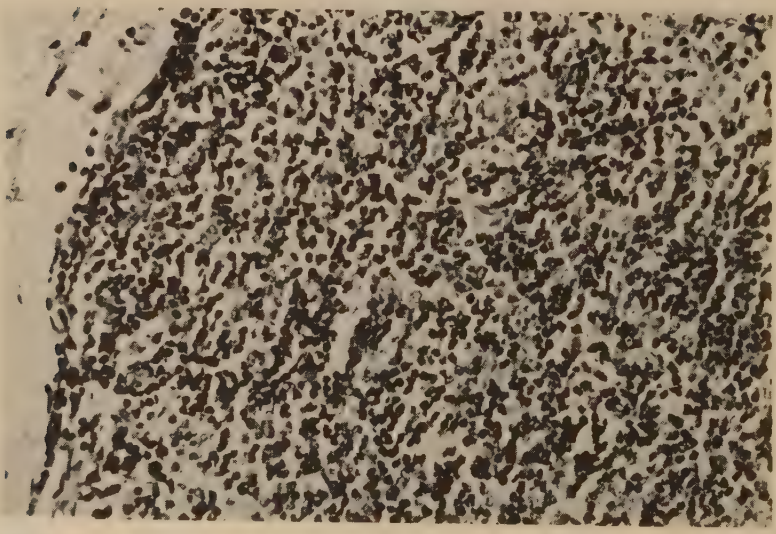


Abb.9. Schnitt durch die Rinde eines axillären Lymphknotens von einer Maus, die in 10 Tagen 15 mg NKS-IgG erhalten hatte. 1 : 400, H.E.

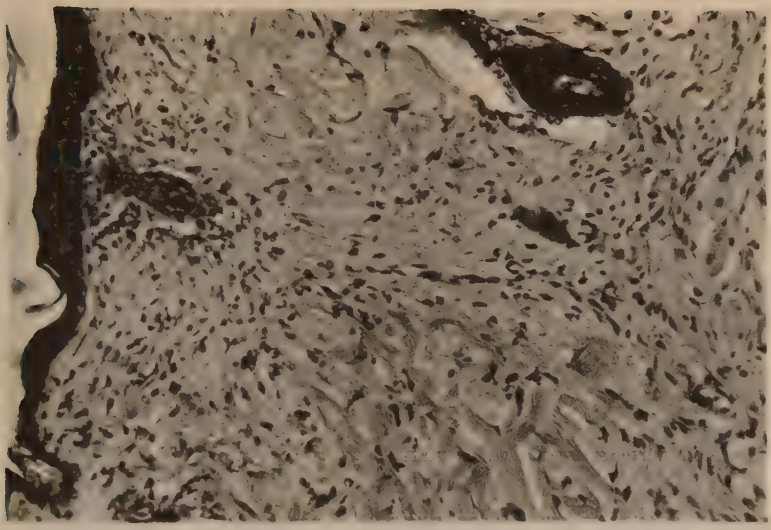


Abb.10. Grenze zwischen Transplantat (C57/Bl,oben) und Wirt (NMRI,unten) am 6. Tag nach der Transplantation nach einer Behandlung mit insgesamt 12,5 mg AMT-IgG. 1 : 200, H.E.

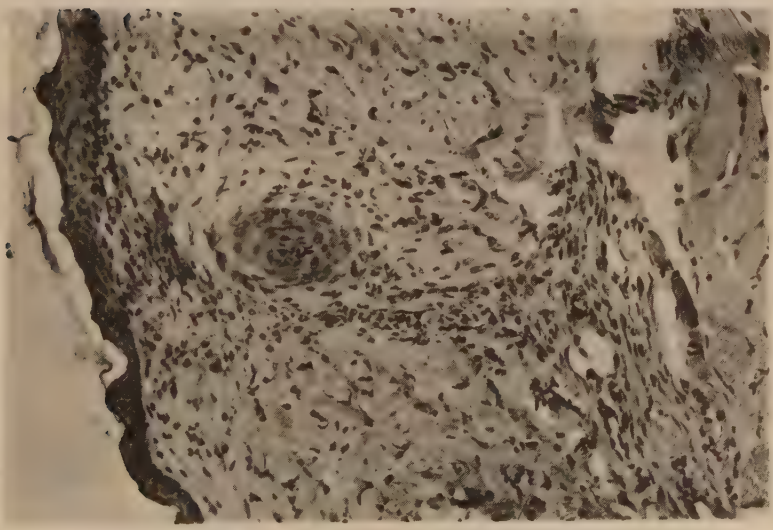


Abb.11. Grenze zwischen Transplantat (C57/Bl,oben) und Wirt (NMRI,unten) am 6.Tag nach der Transplantation nach einer Behandlung mit insgesamt 12,5 mg NKS-IgG. 1 : 200, H.E.

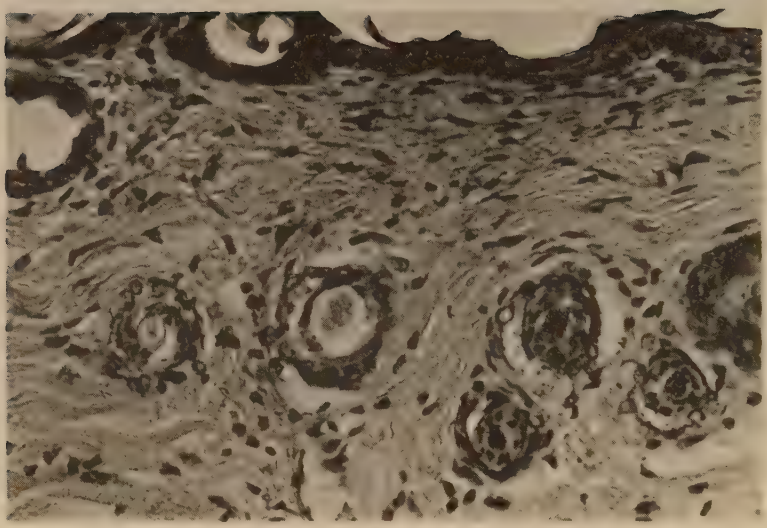


Abb.12. Grenze zwischen Transplantat (C57/Bl, rechts,stark pigmentierte Haarwurzeln) und einem mit insgesamt 20 mg AMT-IgG behandelten Wirt (NMRI,links, nicht pigmentierte Haarwurzeln) am 12. Tag nach der Transplantation. 1 : 400, H.E.

VI) L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S .

1) ABAZA, H. M., B. NOLAN, G. WATT and M. F. A. WOODRUFF: Effect of antilymphocytic serum on the survival of renal homotransplants in dogs. Transplant. 4, 618 (1966).

2) AMOS, D. B.: The use of simplified systems as an aid to the interpretation of mechanism of graft rejection. Progr. Allergy 6, 468 (1962).

3) AMOS, D. B. and N. PEACOCKE: in Proc. 9th Congr. Europ. Soc. Haemat., Lisbon. Basel, N.Y., S. Karger, 1132 (1963).

4) BALNER, H.: in'Antilymphocytic Serum', Ciba Foundation Study Group, no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 71 (1967).

5) BALNER, H. zit. von P. B. MEDAWAR in'Antilymphocytic Serum', Ciba Foundation Study Group no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 153 (1967).

6) BALNER, H. and H. DERSJANT: Effects of antilymphocyte sera in primates. In'Antilymphocytic Serum', Ciba Foundation Study Group no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 85 (1967).

7) BESREDKA: La leucotoxine et son action sur le système leucocytaire. Ann. Inst. Pasteur 14, 390 (1900).

8) BILLINGHAM, R. E. and P. B. MEDAWAR: The technique of free skin grafting in mammals. J. exp. Biol. 28, 385 (1951).

9) BOAK, J. L., M. FOX and R. E. WILSON: Activity of lymphoid tissues from ALS-treated mice. Lancet 1967/I, 750.

10) BOYSE, E. A., L. J. OLD and J. CHOUROULINKOV: Cytotoxic test for demonstration of mouse antibody. In 'Methods in Medical Research' Vol. 10, H. N. EISEN ED. in Chief, 39 (1964).

11) CHARD, T., M. E. FRENCH and J. R. BATCHELOR: Enhancement of the C57/Bl Leukemia E. L. 4 by Fab-Fragments of isoantibody. Transplant. 5/5, 1266 (1967).

12) CHEW, W. B. and J. S. LAWRENCE: Antilymphocytic serum. J. Immunol. 33, 271 - 278 (1937).

13) COHEN, S. and C. MILSTEIN: Structure of antibody molecules. Nature 214, 449 (1967).

14) CRUICKSHANK, A. M.: Anti-lymphocytic serum. Brit. J. exp. Path. 22, 126 (1941).

15) DENMAN, A. M., E. P. FRENKEL and M. ZIFF: Response of the thymus to immunological induced lymphopenia. Proc. Soc. exp. Biol. and Med. 125/4, 1127 (1967).

16) DEUTSCH, L.: Contribution à l'étude de l'origine des anticorps typhiques. Ann. Inst. Pasteur 13, 689 - 727 (1899).

17) DRESSER, D. W. and H. H. WORTIS: Use of an antiglobulin serum to detect cells producing antibody with low hemolytic efficiency. Nature 208, 859 (1965).

18) ELKINS, W. L.: Invasion and destruction of homologous kidney by locally inoculated lymphocytes. J. exp. Med. USA 120/1, 329 (1964).

19) FLEXNER, S.: The pathology of lymphotoxic and myelotoxic intoxication. Univ. Penn. Med. Bull. 15, 287 (1902).

20) FRIEDMANN, H., I. R. SCHWARTZ and A. BANNETT: Suppression of antibody-forming cells in vivo and in vitro by thymic antiserum. Abstracts of the First Internat. Congr. of the Transplantation Soc. Paris 146 (1967).

21) FRIES, D., P. BRYON, N. BRUNAT, J. BROCHIER, M. CARRAZ, C. VEYSSERE, Y. PREVOST et J. TRAEGER: Ultrastructure des lymphocytes transformés in vitro sous l'action d'un serum antilymphocyte humain. Abstracts of the First Internat. Congr. of the Transplantation Soc., Paris. 128 (1967).

22) GOWANS, J. L.: Initiation of immune response by small lymphocytes. Nature 196, 651 (1962).

23) GOWANS, J. L.: The role of lymphocytes in the destruction of homografts. Brit. med. Bull. 21/2, 329 (1964).

24) GOWANS, J. L. in'Antilymphocytic Serum; Ciba Foundation Study Group no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill , 159 (1967).

25) GRAY, J. G., A. P. MONACO, M. L. WOOD and P. S. RUSSELL: Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. I. In vitro and in vivo properties. J. Immunol. 96/2, 217 (1966).

26) GUTTMAN, R. D., C. B. CARPENTER, R. R. LINDQUIST and I. P. MERRILL: Treatment with heterologous antithymus-sera: Nephritis associated with modification of renal allograft rejection and the immune status of the host to the foreign protein. Transplant. 5/4, 1115 (1967).

27) HALPERN, B. N., P. LIACOPOULOS, C. MARTIAL-LASFARGUES et R. ARACTINGI: Allongement de la durée de survie des homogreffes cutanées chez le lapin et le corbaye au cours de la paralysie immunitaire induite par l'administration de -globulines hétérologues. C. r. Soc. Biol. 157, 740 (1963).

28) HEIDE, H. und K. HAUPT: Behringwerke Mitt. 43, 161 (1964).

30) INDERBITZIN, T.: The rèlationship of lymphocytes, delayed cutaneous allergic reactions and histamine. Int. Arch. Allergy 8, 150 - 159 (1956).

31) INDERBITZIN, T.: Das Problem der allergischen Reaktionsmechanismen. Int. Arch. Allergy 9, 146 (1956).

32) IWASAKI, Y., K. A. PORTER, J. R. AMEND, T. L. MARCHIORO, V. ZÜHLKE and T. E. STARZL: The preparation and testing of horse antidog and antihuman antilymphoid plasma or serum and its protein fractions.
Surgery Gynec. Obstet. 124, 1 (1967).

33) KALISS, W.: Immunological enhancement of tumor homografts in mice. Cancer Research 18/2, 992 (1958).

34) LAWRENCE, W. and M. SIMONSEN: The property of strength of histocompatibility antigens and their ability to produce antigenic competition. Transplant. 5/5, 1304 (1967).

35) LEVEY, R. H. and P. B. MEDAWAR: Nature and mode of action of antilymphocytic antiserum. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 56, 1130 (1966).

36) LEVEY, R. H. and P. B. MEDAWAR: Some experiments on the action of antilymphoid antisera. Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 164 (1966).

37) LEVEY, R. H. and P. B. MEDAWAR: Further experiments on the action of antilymphocytic antiserum. Proc. nat. Acad. Sci. 58, 470 (1967).

38) LOWRY, O. H., N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR and R. J. RANDALL: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265 (1951).

39) Mc GREGOR, D. D. and I. L. GOWANS: Survival of homografts of skin in rats depleted of lymphocytes by chronic drainage from the thoracic duct. Lancet 1964/I, 629 - 632.

40) MEDAWAR, P. B.: The behaviour and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits. J. Anat. 78, 176 (1944).

41) MEDAWAR, P. B. in Antilymphocytic Antiserum, Ciba Foundation Study Group no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 154 (1967).

42) MERRITT, K. and A. G. JOHNSON: Studies on the adjuvant action of bacterial endotoxins on antibody formation. VI. Enhancement of antibody formation by nucleic acids. J. Immunol. 94, 416 (1965).

43) METCALF, D.: The thymic origin of the plasma lymphocytosis stimulating factor. Brit. J. of Cancer 10, 442 (1956).

44) METCHNIKOFF, E.: Etudes sur la résorption des cellules. Ann. Inst. Pasteur 13, 737 (1899).

45) MITCHISON, N. A.: Passive transfer of transplantation immunity. Proc. Roy. Soc. B 142, 72 (1954).

46) MÖLLER, G.: Demonstration of mouse isoantigens at cellular level by fluorescent antibody-technique. J. exp. Med. 114, 415 (1961).

47) MONACO, A. P., M. L. WOOD, B. A. VAN DER WERF and P. S. RUSSELL: Effects of antilymphocyte serum in mice, dogs and man.' Antilymphocytic Serum,' Ciba Foundation Study Group, no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 111 (1967).

48) MORSE, S. J. and S. K. RIESTER: Studies on the leukocytosis and lymphocytosis induced by Bordetelle pertussis. J. exp. Med. 125, 401 (1967).

49) NAGAYA, H. and H. O. SIEKER: Allograft survival: effect of antiserums to thymus glands and lymphocytes. Science 150, 1181 (1965).

50) NELSON, D. S.: Immunological enhancement of skin homografts in guinea pigs. Brit. J. exp. Path. 43, 1 (1962).

51) NISONOFF, A.: Enzymatic digestion of rabbit globulin and antibody and chromatography of digestion products, in 'Methods in Medical Research', Vol.10, p. 134. Chicago 1964.

52) OSOBA, D. and J. F. P. A. MILLER: The lymphoid tissues and immune responses of neonatally thymectomized mice bearing thymic tissue in millipore diffusion chambers. J. exp. Med. USA 119, 177 (1964).

53) OVARY, Z.: The structure of various immunoglobulins and their biologic activities. Ann. N.Y. Acad. Sci. 129, 776 (1966).

54) PAPPENHEIMER, A. M.: Experimental studies on lymphocytes. J. exp. Med. USA 25, 635 und 26, 163 (1917).

55) PICHLMAIER, H.: Die Bedeutung der Lymphozyten für die Homotransplantation. Langenbecks Arch. klin. Chir. 315, 1 (1966).

56) PICHLMAYR, R.: Herstellung und Wirkung heterologer Antihundelymphozytenseren. Z. Ges. exp. Med. 143, 161 (1967).

57) RIETHMÜLLER, G.: Antilymphocyte serum. Letter to the ed. Lancet 1967/II, 1210.

58) RIETHMÜLLER, G., P. RIEBER and D. RIETHMÜLLER: Effect of intact and of pepsin-digested anti-mouse-thymus-IgG on antibody-forming spleen cells and on the homograft reaction. Abstracts of the First Internat. Congr. of the Transplantation Soc. p. 155. Paris 1967.

59) RIETHMÜLLER, G., P. RIEBER and D. RIETHMÜLLER: Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus von heterologen Antilymphozyten-Globulinen. Klin. Wschr. 1968, 44 - 46.

60) RIETHMÜLLER, G., D. RIETHMÜLLER, H. STEIN and P. HAUSEN: In vivo and in vitro properties of intact and pepsin-digested heterologous anti-mouse thymus antibodies. J. Immun. 1968, in press.

61) RUSSE, H. P. and A. J. CROWLE: A comparison of thymectomy and anti-thymocyte-serum treated mice in their development of hypersensitivity to protein antigens. J. Immun. 94/1, 74 - 83 (1965).

62) SIMONSEN, M.: Graft versus host reactions. Their natural history, and applicability as tools of research. Progr. Allergy 6, 349 (1962).

63) SNELL, G. D. and J. H. STIMPFLING: Genetics of tissue transplantation, in Biology of the Laboratory Mouse. E. L. GREEN ed. The Jackson Lab. 2nd edition 1966, p. 457.

64) STARZL, T. E., T. L. MARCHIORO, D. E. HUTCHISON, K. A. PORTER, G. J. CERILLI and L. BRETTSCHNEIDER: The clinical use of antilymphocyte globulin in renal homotransplantation. Transplant. 5/4, 1100 (1967).

65) TAUB, R. N. in 'Antilymphocytic Antiserum', Ciba Foundation Study Group, no. 29, ed. G. E. W. WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 152 (1967).

66) THOMPSON, J. S.: An in vitro study of antileukemic serum. Blood 10, 1228 (1955).

67) TURK, J. L. and D. A. WILLOUGHBY: Central and peripheral effects of antilymphocyte sera. Lancet 1967/I, 251.

68) WAKSMAN, B. H., S. ARBOUYS and B. G. ARNASON: The use of specific lymphocyte antisera to inhibit hypersensitive reactions of the delayed type. J. exp. Med. 114, 997 - 1022.

69) WEIGLE, W. O. and G. J. HIGH: Antigenic competition. J. Immunol. 99/2, 392 (1967).

70) WOODRUFF, M. F. A. and B. FORMAN: Evidence for the production of circulating antibodies by homografts of lymphoid tissue and skin. Brit. J.exp. Path. 31, 306 (1950).

71) WOODRUFF, M. F. A. and I. M. ZEISS: An investigation of immunological tolerance based on chimaera analysis. J. Immunol. 4, 413 (1961).

72) WOODRUFF, M. F. A. and N. F. ANDERSON, Ann. N.Y. Acad. Sci. 120, 119 (1964).

73) WOODRUFF, M. F. A., K. JAMES, N. F. ANDERSON and B. L. REICH: In vivo and in vitro properties of antilymphocytic serum. In 'Antilymphocytic Serum,' Ciba Foundation Study Group no. 29, ed. G. E. W . WOLSTENHOLME and M. O. O'CONNOR. London: J. & A. Churchill, 57 (1967).

74) WRIGHT, P. W.: Specific tolerance to H-2-isoantigen induced by enhancing antibody. Abstracts of the First Internat. Congr. of the Transplantation Soc., p.80. Paris 1967.

Herrn Professor Dr. H.E. Bock danke ich für die Überlassung eines Arbeitsplatzes an seiner Klinik und Herrn Dr. G. Riethmüller für die sachkundige Beratung bei der Ausführung der Versuche.

L e b e n s l a u f

Ich, Ernst-Peter Rieber, wurde am 5. Juni 1941 als einziges Kind des jetzigen Oberstudiendirektors Dr. phil. Ernst Rieber und seiner Frau Helene Dorothea, geb. Steinbronn, in Tübingen geboren. Nach dem Besuch der Volksschule von 1947 bis 1951 trat ich 1951 in das Uhlandgymnasium Tübingen ein, wo ich im März 1960 die Reifeprüfung ablegte. Im Sommersemester 1960 fing ich an der Universität Tübingen an, Chemie zu studieren. Im Sommersemester 1962 begann ich an derselben Universität mit dem Studium der Medizin, in dessen Verlauf ich im März 1963 die naturwissenschaftliche Vorprüfung, im April 1965 die ärztliche Vorprüfung und am 18. Februar 1969 die ärztliche Prüfung ablegte.